

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Nutrición y Bromatología I  
(Nutrición)



## TESIS DOCTORAL

**Factores nutricionales, lipoproteicos u hormonales como marcadores  
precoces de insulinoresistencia y enfermedad cardiovascular en recién  
nacidos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Eva Gesteiro Alejos**

Directores

Francisco José Sánchez Muniz  
Sara Bastida Codina

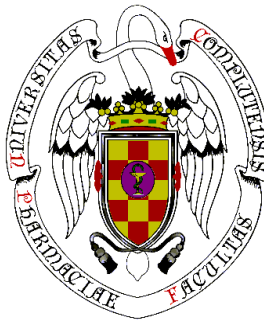
**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE**

**NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)**



**MEMORIA TESIS DOCTORAL**

**EVA GESTEIRO ALEJOS**

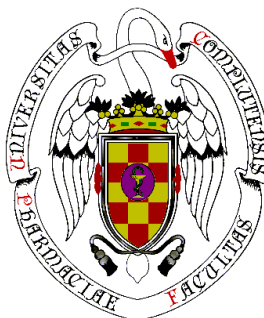
MADRID, Enero 2015



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)**



**“FACTORES NUTRICIONALES, LIPOPROTEICOS Y  
HORMONALES COMO MARCADORES PRECOCES DE  
INSULINORRESISTENCIA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR  
EN RECIÉN NACIDOS”**

**Directores**

**Profesor Francisco J. Sánchez Muniz**

**Profesora Sara Bastida Codina**

**MEMORIA TESIS DOCTORAL**

**EVA GESTEIRO ALEJOS**

**Para optar al grado de Doctor en Farmacia**

**MADRID, Enero 2015**





Los Directores de la Tesis Doctoral titulada “Factores nutricionales, lipoproteicos y hormonales como marcadores precoces de insulinoresistencia y enfermedad cardiovascular en recién nacidos” el Prof. Dr. Francisco José Sánchez Muniz y la Prof. Dra. Sara Bastida Codina

CERTIFICAN

Que la parte experimental de esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Hospital de Mérida, la Universidad Complutense de Madrid y la Universidad de Valencia.

Que los ensayos que se recogen en esta Tesis Doctoral se han realizado siguiendo los procedimientos estándar del Comité de Ética Hospital de Mérida y los de la Declaración de Helsinki como está indicado en la memoria del Proyecto. Todos los voluntarios participantes fueron informados de forma clara y concisa de los objetivos y aspectos concretos del estudio y firmaron un consentimiento informado con anterioridad al inicio del estudio.

Que dicha Tesis está inscrita con fecha 26 de febrero de 2006 y que el 15 de enero de 2015 obtuvo el visto bueno del Consejo de Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense para su presentación, lectura y defensa.

Lo que certifican en Madrid, a dieciséis de enero de dos mil quince.

Dr. Francisco José Sánchez Muniz

Dra. Sara Bastida Codina





D<sup>a</sup> Ana María López Sobaler, Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

#### CERTIFICA

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada “Factores nutricionales, lipoproteicos y hormonales como marcadores precoces de insulinoresistencia y enfermedad cardiovascular en recién nacidos” presentada por D<sup>a</sup> Eva Gesteiro Alejos reúne todos los requisitos para ser leída y defendida en tiempo y forma.

Lo que firmo en Madrid a quince de enero de dos mil quince

VºBº del Director de Departamento de Nutrición y Bromatología I  
(Nutrición)



*A mis padres, mi hermana y mi marido,  
compañeros incansables en este camino,  
y a mis hijas que llegaron mientras lo recorriamos.*

*Para todas las personas que con el tiempo,  
en una u otra forma,  
se verán beneficiadas del trabajo que hemos realizado*



## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Profesor Dr. Francisco José Sánchez-Muniz, por su confianza en mí, su dedicación y constancia en el trabajo, y por el cariño que me ha demostrado en estos años.

A la Profesora Dra. Sara Bastida Codina, por poner su experiencia, su conocimiento y su esfuerzo a mi servicio, y por encargarse de “todas esas cosas” que también hay que hacer, aunque no luzcan demasiado.

A ambos por abrirme las puertas de su casa y por su generosidad.

En el Hospital de Mérida:

Al Servicio de Laboratorio, en particular al Jefe de Servicio, el Dr. Arturo Fernández de los Ríos Martín, por su colaboración en todo lo que necesité y por poner a mi disposición todos los recursos del Laboratorio; al Dr. Manuel Espárrago Rodilla por animarme a realizar esta investigación y ponerme en contacto con el Profesor Sánchez-Muniz; a la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Mesa por su colaboración en la parte experimental, a la Dra. M<sup>a</sup> Carmen de San José por su inmensa ayuda en todo lo relativo al trabajo en el Laboratorio de Investigación y Biología Molecular, y al equipo de Técnicos de Laboratorio que colaboraron en la recogida de muestras cuando yo no podía estar presente.

A los ginecólogos y matronas del Servicio de Ginecología y Obstetricia por su colaboración activa en la recogida de muestras y por facilitarme el acceso a la información necesaria para realizar esta Tesis.

Al Servicio de Archivo, por facilitarme el trabajo con las Historias Clínicas.

A la Biblioteca, por su gran eficacia al ayudarme con algunas búsquedas bibliográficas.

En la Universidad de Valencia:

A las Dras Dolores Corella, Marisa Guillén y Carolina Ortega, por su colaboración en la parte experimental y en la publicación de algunos resultados de esta Tesis.



En la Universidad Complutense de Madrid:

A la Profesora Ángeles Carbajal Azcona por ayudarme en el diseño de la encuesta nutricional empleada en este trabajo.

A Miguel Vázquez por participar activamente en la parte experimental.

A D<sup>a</sup> Carmen Bravo del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid por su gran ayuda en el manejo de algunos datos.

A la Dra. Ana M<sup>a</sup> López Sobaler por su diligencia y gran ayuda con los “milagros” de última hora.

A la Dra. Meritxell Nus por dedicar parte de su tiempo a enseñarme a realizar algunas determinaciones fundamentales para este trabajo.

Y por supuesto,

A todas las mujeres que de forma voluntaria y desinteresada quisieron participar en este proyecto.

A mi padre, con quien aprendí cómo es la vida del investigador, la disciplina del trabajo, la paciencia para esperar resultados, y que todo puede ser importante.

A mi madre por su apoyo incondicional.

A mi marido por ponérmelo siempre tan fácil.

A todos los amigos y compañeros que durante todo este tiempo han mostrado su interés en el desarrollo de esta Tesis sin cansarse de preguntar ¿qué tal vas?

## ÍNDICE

	PÁGINA
<b>RESUMEN EN INGLÉS. PhD SUMMARY</b>	23
RESUMEN EN INGLÉS DE LA TESIS. SUMMARY OF PHD THESIS	25
ABREVIATURAS	31
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	35
INTRODUCCIÓN	37
GENERALIDADES DEL EMBARAZO	37
ASPECTOS METABÓLICOS	37
DIABETES GESTACIONAL	39
DIETA MATERNA	40
GANANCIA DE PESO	42
CRECIMIENTO FETAL	43
PLACENTA	44
TRANSFERENCIA MATERNO-FETAL DE NUTRIENTES	45
TRANSPORTE DE GLUCOSA	46
TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS	48
TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRASOS	50
TRANSPORTE DE COLESTEROL	52
TRANSPORTE DE ALCOHOL	54
INFLUENCIA DEL ENTORNO INTRAUTERINO SOBRE LA SALUD EN LA INFANCIA Y EN LA VIDA ADULTA. PROGRAMACIÓN FETAL	55
FACTORES QUE INCIDEN EN LA FUNCIÓN PLACENTARIA Y QUE CONDUCEN A ALTERACIONES EN EL PATRÓN DE DESARROLLO FETAL	56
DESARROLLO DEL PÁNCREAS	58
METABOLISMO LIPÍDICO	59
TRANSPORTE DE LA GRASA DIETÉTICA O EXÓGENA HASTA EL HÍGADO	61
TRANSPORTE HEPÁTICO DE LA GRASA ENDÓGENA A LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS	62
TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL	67
HETEROGENEIDAD DE LIPOPROTEÍNAS Y RIESGO CARDIOVASCULAR	69
METABOLISMO EN EL RECIÉN NACIDO	71

METABOLISMO LIPOPROTEICO	71
COLESTEROL	72
TRIGLICÉRIDOS	74
LIPOPROTEÍNAS	76
CONDICIONES PERINATALES Y NIVELES DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS EN SANGRE DE CORDÓN	80
METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA	83
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA PERINATAL. EL CICLO GLUCOSA/ÁCIDOS GRASOS	84
LA GLUCEMIA EN EL FETO Y EL NEONATO	86
SÍNDROME METABÓLICO	87
DEFINICIÓN	87
ETIOPATOGENIA	88
OBESIDAD	89
RESISTENCIA A LA INSULINA	89
CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA	90
DESARROLLO PERINATAL Y SÍNDROME METABÓLICO	91
DIETA MEDITERRÁNEA	92
DIETA MEDITERRÁNEA Y EMBARAZO	98
ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA	99
APROXIMACIÓN A GENES CANDIDATOS	102
GEN DE LA Apo A5	103
GEN FTO	104
<b>2. OBJETIVOS</b>	107
OBJETIVOS	109
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	111
MATERIALES Y MÉTODOS	113
DISEÑO EXPERIMENTAL	113
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	114
ANTROPOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS	118
DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LOS NEONATOS Y LAS MADRES	120
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	120
BIOQUÍMICA	120

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	126
DETERMINACIÓN DE HORMONAS	127
CONTROL DE CALIDAD	130
OTRAS DETERMINACIONES	131
DETERMINACIONES GENÉTICAS	132
ENCUESTA NUTRICIONAL	135
TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	139
ASPECTOS ÉTICOS	142
<b>4. RESULTADOS</b>	143
RESULTADOS	145
PUBLICACIÓN 1	145
PUBLICACIÓN 2	173
PUBLICACIÓN 3	189
PUBLICACIÓN 4	199
PUBLICACIÓN 5	213
PUBLICACIÓN 6	225
PUBLICACIÓN 7	235
PUBLICACIÓN 8	247
PUBLICACIÓN 9	259
<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	289
DISCUSIÓN	291
DISCUSIÓN INTEGRADORA	292
<b>6. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	313
RESUMEN Y CONCLUSIONES	313
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	319
BIBLIOGRAFÍA	321



**RESUMEN EN INGLÉS**

**PhD SUMMARY**



## RESUMEN EN INGLÉS DE LA TESIS SUMMARY OF PHD THESIS

### **Nutritional, lipoproteic, and hormonal factors as early biomarkers of insulin resistance and cardiovascular disease at birth.**

Eva Gesteiro Alejos

#### **Background**

Several endocrine regulators are involved in fetal growth and insulin resistance development later in life. In addition, cardiovascular diseases are considered pediatric diseases with several evidences that the pathological origin takes place during pregnancy, with important contribution of genetic profile and maternal diet. Insulin plays an important role during the fetal growth; it modulates the lipogenic activity, and has a permissive activity in the hepatic glycogen and protein synthesis. Fetal insulin production is closely related to the facilitated transplacental diffusion of glucose (Aasvee et al., 2004). However, this diffusion is highly modulated by several factors (neonatal, maternal, and derived from the child-mother interaction). Moreover, the nutritional status plays a determinant role on pancreatic development and hormone production, which in turn, would determine the cell insulin and glucose availability and sensitivity (Álvarez Escolá & Escrivá Pons, 2008). Glucose tolerance alteration during pregnancy has been established as one of the most valuable tests for the diagnoses of gestational diabetes and the risk to develop childhood diabetes (O'Sullivan, 1998).

The detection of high total cholesterol (TC), apolipoprotein (Apo) B, and the low Apo A1, Apo A1/Apo B ratio in umbilical cord blood from term newborns could identify higher risk for cardiovascular disease (CVD) in neonates (Aasvee et al., 2004; Casanueva et al., 1998; Srinivasan & Berenson, 1995). Early identification of candidates for developing the Metabolic Syndrome (MS) and, thus, type 2 Diabetes (T2DM) and/or CVD should be demanded, as these conditions are becoming every day more frequent in children and adolescents (Lissau et al., 2004; Zimmet et al., 2007a, 2007b). Our group has shown that the level of some CVD risk markers (e.g. TC, TC/cholesterol transported by HDL (TC/HDL-c), Apo A1/Apo B) at age 4 can be predicted considering these biomarkers at birth and those of their respective parents (Bastida et al., 2007).

Elevated serum lipoprotein (a) (Lp(a)) (Luc et al., 2002) and total homocysteine (tHcyt) (Veeranna et al., 2011) have been suggested to be independent risk factors for atherosclerosis and CVD. Delivery represents a significant stress to both mother and child. The dramatic decrease of fetal antioxidant capacity at the end of labor may induce lipoprotein oxidation increase. It has been suggested that the arylesterase (AE) activity associated to paraoxonase (PON 1) protects LDL and HDL from lipid peroxidation (Aviram et al., 1998a). However, few studies have defined normality ranges for oxidized LDL (oxLDL) and AE in full-term neonates.

Normality ranges assessment for glucose homeostasis markers at birth needs of a strict deletion of factors that can influence neonatal glycemia and/or insulinemia (cord blood contamination with maternal effluxes, maternal glycemia and insulinemia, birth weight, fetal distress, etc.). Same related to lipoprotein and other CVD markers (AE, tHcyt, etc.). Moreover, the concurrence of altered lipids and insulin sensitivity/resistance markers at birth has been scarcely investigated. Taking into account previous premises on marker tracking, it can be suggested that neonates presenting concurrence of two MS compounds are more prone to develop that syndrome later in life.



Nutritional availability and status during gestation are main determinants of placental and neonatal growth and development (Meltzer et al., 2011; Timmermans et al., 2012). Among several indices used for evaluating diet quality, two of them have deserved special interest as they measure the “global” diet quality according to different parameters (number of food group servings, variety, dietary contribution of some nutrients and substances, dietary habits): the Healthy Eating index (HEI) and the Mediterranean diet adherence (MDA). The HEI and the MDA have been used in pregnancy but their relationships with some disease markers are scarcely known and they have never been related to insulin sensitivity and CVD biomarkers at birth. The Mediterranean diet has been considered one of the healthiest diets as its consumption is associated with a low prevalence of major degenerative diseases. It is rich in vegetable foods and moderately rich in fish, poor in red meat, and olive oil is almost its exclusive culinary oil (Sánchez-Muniz, 2007; Trichopoulou et al., 2003; Estruch et al., 2013). This food combination assures a proper fatty acid (FA) profile and a large content of vitamins as well as bioactive and antioxidant compounds.

The Barker (1995) hypothesis has grown during the last few decades as scientific evidence on the perinatal influence in the origin and development of adult diseases (Palinski & Napoli, 2002). However, this information is addressed mainly to limited pregnancy affecting fetal growth and giving rise to small-for-gestational-age-children. Although information on the protective effects of adequate and balanced diets on glucose homeostasis and CVD in adults is vast, the information of the potential benefits of these diets during pregnancy is scarce.

All biomarkers are the result of both genetic control and interaction. Nutritional compounds could modify the gene expression giving rise to alteration and modulation of several factors engaged in metabolism and physiopathological processes. Furthermore, the response to dietary compounds is highly different among subjects and depends on the presence of gene polymorphisms. Some of them explain with relatively high statistical strength data variability; thus, are called “candidate genes” (Sánchez-Muniz & Nus, 2008; Ordovás & Corella, 2004). Apo A5 regulates lipoprotein lipase activity (Charriere et al., 2008; Dallongueville et al., 2008; Marçais et al., 2005), enzyme with a central role in lipoprotein metabolism and adipose and muscular fatty acid uptake. The Apo A5 gene (APOA5) is located on chromosome 11q23 in a cluster with APOA1/C3/A4 (Charriere et al., 2008; Dallongueville et al., 2008; Marçais et al., 2005). In the adult, APOA5 is thought to be expressed primarily in liver; however, no data regarding placental and fetal liver expression is available. In plasma, Apo A5 is associated with HDL and VLDL particles (Niculescu et al., 2007). In addition the fat mass and obesity associated gene (FTO) has been associated with body mass index (BMI) in several studies, altering the body weight of A-homozygous adults about 3 kg. FTO association with increased risk of childhood obesity was also demonstrated by Frayling et al. (2007) although the effects were observed at age seven. The risk alleles have been associated with poorer eating behaviors (Frayling et al., 2007), higher food, energy and fat intakes and specific preference for energy-dense foods with high fat content (Cecil et al., 2008; Wardle et al., 2009; Rodríguez-López et al., 2010). However, there is no information about the effects of these candidate genes polymorphisms on neonatal insulin sensitivity or CVD biomarkers. Furthermore, the mother-gene polymorphism and the infant-mother gene interaction have never been tested.

### **Aims**

Based on previous premises, the main general aim of this PhD memory was to deep on some unknown nutritional, lipoproteic and hormonal aspects related to insulin sensitivity and lipoprotein metabolism at birth.

Derived from this primary objective, other secondary objectives can be proposed:

1.-To review classic and recent researches studying the importance of gestation (including diet) in the metabolic adjustments related to insulin sensitivity/resistance and CVD risk.

2.-To assess normality ranges for glucose, insulin, GH, cortisol, IGF-1, the Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) and the Homeostatic metabolic assessments (HOMAs) in a term-neonatal sample whose maternal glucose tolerance was non-affected during pregnancy.

3.-To assess normality ranges for lipids, lipoproteins, Lp(a), CVD ratios, homocysteine, oxidized-LDL, and arylesterase in a term-neonatal sample.

4. To know the prevalence of dysglycemia and dyslipemia concurrence among neonates and to ascertain its influence on insulin sensitivity and CVD biomarkers.

5.-To assess the influence of maternal glucose tolerance during gestation and the level of insulin sensitivity/resistance markers at birth.

6.-To analyze the quality of the maternal diet based on MDA-score and HEI-score during pregnancy.

7.-To determine the influence of the pregnancy HEI-score on maternal glycemia and cholesterolemia.

8.-To determine the influence of the pregnancy diet on neonatal insulin sensitivity/resistance biomarkers and on homocysteine, arylesterase, lipid and lipoproteins at birth.

9. To check the effects of APOA5 and FTO polymorphisms on anthropometric parameters, insulin sensitivity/resistance and CVD biomarkers at birth.

10.-To study the pregnancy diet quality and its possible effect on CVD and insulin sensitivity/resistance markers at birth, taking into account the rs9939609 FTO polymorphism mother-child concurrence

### **Sample and Methods**

The Mérida Study has been achieved in a total of 225 single neonates, born at the Mérida Hospital during 1-year period. From personal surveys performed during the obstetrical period, from the Hospital delivery records and from laboratory analysis, we obtained data on

- a) Mothers: Age, weight, pregnancy weight gain, primarity/multiparity, delivery type and complications, pregnancy glucose tolerance according to the O'Sullivan test. Food consumption surveys to obtain data about pregnancy diet quality and possible dietary habits were done.
- b) Neonates: anthropometrical parameters (height, weight, BMI, PI), Apgar score at the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> minutes.

At delivery, in order to avoid possible contamination with maternal blood, efflux, and DNA, neonatal blood was obtained by umbilical arterial puncture. We analyzed and calculated the following parameters: TC, HDLc, LDLc, VLDc, Lp(a), triglycerides (TG), Apo A1, Apo B, oxLDL, as TC/HDLc, LDLc/HDLc, TG/HDLc, Apo A1/Apo B, Apo A1/HDLc, Apo B/LDLc, LDLox/LDLc and AE/HDLc; GH, IGF-1, glucose, insulin, GH, cortisol, HOMA, QUICKI and the glucose/insulin and insulin/cortisol ratios. Genomic DNA was obtained and the S19W APOA5 and rs9939609 FTO polymorphism prevalences tested. The potential influence of the FTO and APOA5 gene polymorphisms (child, mother and child-mother interaction) on the already commented biomarkers was also evaluated.

### **The results obtained have permitted to announce the following conclusions**

#### **A. On the Bibliographic reviews.**

1. Maternal diet affects embryonic and fetal growth, development and maturation.
2. When malnutrition is stated weight gain reduction takes place. This situation is highly dependent on duration, affecting pancreas size and activity.

3. Metabolic adaptations to reduced maternal intakes induce fetal insulin sensitivity increase and make the child more efficient to subsist into limited environments. This permanent programming becomes deleterious when abundant energy and nutrients are available.
4. Proper adherence to Mediterranean diets confers more adequate growth during first months of pregnancy.
5. Adequate Mediterranean diet adherence diets show a more correct source of energy, carbohydrates, fat, dietary fibre and saturated fatty acids to carbohydrates ratio than their low adherence Mediterranean diet counterparts.

**B. About normality ranges and cardiovascular disease and insulin sensitivity/resistance risk factors concurrence at birth**

1. Our study has permitted to assess normality ranges in cord blood for insulin sensitivity/resistance markers (glucose, insulin, GH, IGF-1, cortisol, HOMA-IR, HOMA-IS, QUICKI, glucose/insulin and insulin/cortisol ratios).
2. Normality ranges were established for lipoproteins (LDLc, HDLc, VLDLc, Lp(a), oxLDL) arylesterase and homocysteine in a sample of selected neonates.
3. Neonatal insulinemia affects insulin sensitivity/resistance markers more than maternal glucose tolerance, suggesting that other factors, different from maternal glucose tolerance, are engaged at birth.
4. This is the first study relating homocysteine, lipoproteins and apolipoproteins to insulin sensitivity/resistance markers in a relatively ample sample of selected neonates according to normality ranges.
5. The concurrence of dysglycemia and dyslipemia (decreased HDLc or increased triglycerides) impaires the insulin resistance markers and negatively modifies the lipoprotein profile at birth.

**C. About pregnancy diet characteristics and its neonatal influences**

1. Diets followed during pregnancy showed the same limitations observed in other Spanish women: low carbohydrate and fibre contents, and elevated of fat, cholesterol and saturated fatty acids.
2. More than 50% of studied mothers showed inadequate diets according to the HEI, while about one third presented low MDA.
3. Diet quality was uniform through gestation. None of pregnant women modified their diet enough to change from inadequate to adequate or *vice versa* according to MDA.
4. Women with higher quality diets showed, within normal ranges, higher glycemia and lower cholesterolemia. Pregnants showing high MDA scores had more adequate pregnancy weight gains.
5. Glycemia, insulinemia, and HOMA-IR at birth inversely correlated with the HEI and MDA scores.
6. Adequacy in MDA, since the first trimester, improves the lipoprotein profile and homocysteine levels at birth.
7. According to the relative risks for suffering hyperinsulinemia and hyperglycemia at birth, the HEI appears as a better predictor of diet quality at pregnancy than MDA.
8. On the contrary, MDA during pregnancy defines better than the HEI the effect of maternal diet on CVD risk markers. Neonates whose mothers followed diets with high MDA scores showed lower relative risks for high ApoB, LDLc and homocysteine levels, and for low Apo A1/Apo B ratio.

**D. About the influence of candidate gene polymorphisms**

1. The APOA5 gene affects significantly fetal growth and maturation. Neonates carrying the W allele for the S19W polymorphism were smaller, and tended to present asymmetric growth, suggesting that they received a less optimum nutrition during gestation than their S homozygous counterparts.
2. W-carrier neonates showed lower insulinemia, HOMA-IR, and insulin/cortisol ratio. They presented less LDL particles, although more oxidized, suggesting a worse lipoprotein antioxidant status than their S homozygous counterparts.
3. W-carrier neonates, independently of maternal S19W polymorphism, showed lower BMI, PI and insulin, but the child\*mother W-allele concurrence induced lower IGF-1 levels at birth.
4. A-carrier neonates for rs9939609 FTO polymorphism presented, in general terms, impaired glucose homeostasis.
5. Maternal rs9939609 FTO polymorphism affects insulin sensitivity and CVD markers at birth in an opposite manner as was found for the same polymorphism in the neonate.
6. The A-neonate\*A-mother concurrence improves several neonatal insulin sensitivity markers with respect to the A-neonate\*TT-mother concurrence. Results appear related to the higher MDA of A-carrier mothers.

**General conclusion and indications**

The strict neonatal selection performed to obtain normality ranges of insulin sensitivity/resistance and CVD markers will allow using them as reference values in further studies. The benefits of glucose, triglycerides and HDLc neonatal screening seem evident to identify T2DM and MS candidates, permitting their early prevention and/or treatment.

Nutritional education strategies about pregnancy should be implemented in order to create correct and stable alimentary behaviors, resulting in high quality and high MDA diets consumption during whole pregnancy. These strategies will not only improve mother's health but will give raise long-term metabolic benefits in the child. The follow-up of Mérida study neonates through childhood and adolescence appears useful, in order to consolidate the findings obtained in this PhD memory.

According to the gene-diet interactions observed, the identification of other candidate genes in this Mérida cohort, as well as to develop similar studies in representative samples of other geographic areas seems plausible.

---

*Abbreviations.* AE: arylesterase, Apo: Apolipoprotein, BMI: body mass index, CVD: cardiovascular disease, GH, Growth Hormone, HDLc: cholesterol transported by HDL, HEI: Healthy Eating Index, HOMA: Homeostatic Model Assessment, IGF-1: insulin-like growth factor-1, LDLc: cholesterol transported by LDL, Lp(a): Lipoprotein (a), MDA: Mediterranean Diet Adherence, MS: metabolic syndrome, oxLDL: oxidized LDL, QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index, T2DM: type 2 diabetes mellitus, TC: total cholesterol, TG: triglycerides, tHcy: total homocysteine.



ABREVIATURAS

ABC1: transportador ATP Binding Cassette tipo 1  
ACAT: Acil colesterol acil transferasa  
ACTH: hormona adrenocorticotropa  
ACV: Accidente cerebrovascular  
ADM: Adherencia a Dieta Mediterránea  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
AE: Arilesterasa  
AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición  
AG: Ácidos grasos  
AGA: Apropriados para su edad gestacional (*appropriate for gestational age*)  
AGL: Ácidos grasos libres  
AGM: Ácidos grasos monoinsaturados  
AGP: Ácidos grasos poliinsaturados  
AGPCL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga  
AGS: Ácidos grasos saturados  
Apo: Apolipoproteína  
ARN: ácido ribonucleico  
AUC: área bajo la curva  
CDC: Centro para el control de enfermedades de Atlanta, USA.  
CE: colesterol esterificado ó ésteres de colesterol  
CETP: complejo de transferencia de ésteres de colesterol  
CLA: conjugado del ácido linoleico  
CT: Colesterol total  
DG: Diabetes gestacional  
DHA: ácido docosahexaenoico (22:6,w3)  
DM: Diabetes mellitus  
DM2: diabetes mellitus tipo 2

DTT: Ditiotreitól

EARS: European Atherosclerosis Research Study.

ECLIA: electroquimioluminiscencia

ECV: Enfermedad cardiovascular

EPA: ácido eicosapentaenoico (20:5,w3)

FABP: Proteína de unión a los ácidos grasos (fatty acid binding protein)

FATP: Proteína transportadora de ácidos grasos (fatty acid transport protein)

G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

GH: Hormona de crecimiento

GK: Glicerol kinasa

GPO: Glicerol fosfato oxidasa

Hb: Hemoglobina

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HDLc: Colesterol transportado por HDL

HDLn: partículas HDL nacientes

HK: Hexokinasa

HMG-CoA: Hidroximetil glutaril coenzima A

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance

HOMA-IS: Homeostatic Model Assesment-Insulin Sensitivity

HTA: Hipertensión arterial

IAS: Índice de alimentación saludable

IC: Intervalo de confianza

IDF: Internacional Diabetes Federation

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia

IDR: Ingesta diaria recomendada

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IMC: Índice de masa corporal

INE: Instituto Nacional de Estadística

IP: índice ponderal

---

kcal: kilocalorías

LCAT: lecitin colesterol acil transferasa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLc: Colesterol transportado por LDL

LDLox: LDL oxidadas

LDL-R: receptor de LDL

LGA: Grandes para su edad gestacional (*large for gestational age*)

LH: lipasa hepática

Lp(a): Lipoproteína (a)

LPL: Lipoprotein lipasa

LRP: Proteína receptora parecida a LDL (LDL-like receptor protein)

MTHF: Metil tetrahidrofolato

MTHFR: Metil tetrahidrofolato reductasa

NADP: Nicotin adenin difosfato

NCEP: National Cholesterol Education Program

NCEP-ATPIII: Programa Norteamericano para la detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia en adultos. (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III)

NIH: National Institute of Health (USA)

NIST: National Institute of Standards and Technology (USA)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio

P: Percentil

PAD: presión arterial sistólica

PAS: Tensión arterial sistólica o presión arterial diastólica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilenglicol

PEPCK: fosfoenol-piruvato-carboxikinasa

PL: fosfolípidos



PON: paraoxonasa

PPAR: Receptor activador de la proliferación de peroxisomas.

QM: Quilomicrones

QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

RCIU: Retraso del crecimiento intrauterino

RCV: Riesgo cardiovascular

ROC: *receiver operating characteristics*

ROS: Sustancias reactivas al oxígeno

RT-PCR: PCR a tiempo real

SAH: S-adenosil-L-homocisteína

SBF: Simulated Body Fluid

SE: Error estándar

SEN (SEÑ): Sociedad Española de Nutrición

SENC: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria.

SEQC: Sociedad Española de Química Clínica

SGA: Pequeños para su edad gestacional (*small for gestational age*)

SM: Síndrome metabólico

SNP: Polimorfismo de un sólo nucleótido

SOD: Superóxido dismutasa

SR-B1: Receptor *scavenger* tipo B1

tHcys: Homocisteína total

TG: Triglicéridos

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

UNESCO: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura.

USA: Estados Unidos de América

USDA: Departamento de Agricultura de USA

UV: ultravioleta

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VLDLc: Colesterol transportado por VLDL

---

## **1. INTRODUCCIÓN**

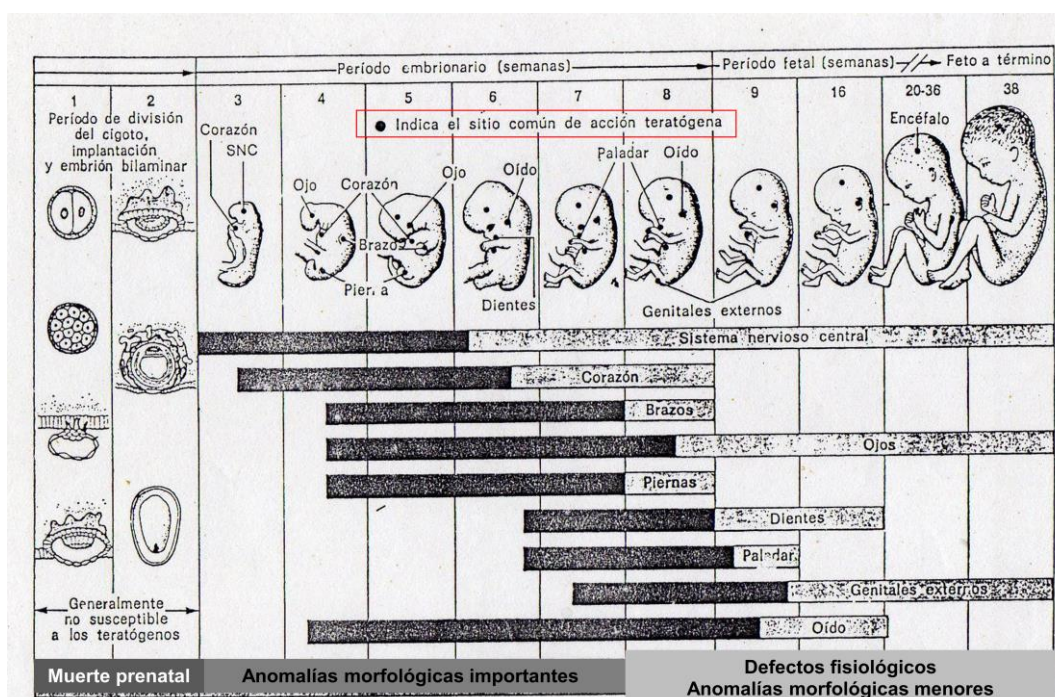


## 1. INTRODUCCIÓN

### GENERALIDADES DEL EMBARAZO

#### ASPECTOS METABÓLICOS

El embarazo en la especie humana dura 10 meses lunares ó 40 semanas. Pueden distinguirse dos etapas fundamentales: el periodo embrionario, que comprende las primeras 8 semanas y el periodo fetal, que abarca desde la semana 9 hasta el parto (David y Haegel, 1970; Moore y Persaud, 2003) (Figura 1.1). Las dos primeras semanas del periodo embrionario son críticas, hasta el punto que en condiciones adversas, puede sobrevenir la muerte del embrión. Entre las semanas 2 y 8, éste es extremadamente vulnerable a los agentes teratógenos, ya que este periodo coincide con el inicio de la organogénesis. Es cuando pueden acontecer las malformaciones más graves debidas a agentes externos (Moore y Persaud, 2003; Thompson y col., 2008; Barker y col., 2008). En el periodo fetal se pueden dar malformaciones de menor entidad, pero lo más importante son las adaptaciones fisiológicas. Esta etapa es susceptible de sufrir ajustes que dan origen a la programación fetal, de la que se hablará más adelante, y que condicionará el desarrollo del nuevo ser (Moore y Persaud, 2003; Thompson y col., 2008; Barker y col., 2008).



**Figura 1.1.** Periodos de máxima vulnerabilidad teratogénica. Tomado de Moore y Persaud (2003).

Durante la gestación se dan dos periodos metabólicos fundamentales: el primero, de índole anabólica o de creación de reservas, y donde el desarrollo feto-placentario es mínimo, y el segundo de carácter catabólico o de movilización de dichas reservas y la adaptación para el parto, en el cual el desarrollo feto-placentario es enorme (Beaton y col., 1954; Herrera, 1988b; Herrera y Ramos, 2008). La primera etapa comprende los dos primeros trimestres. En este periodo, el objetivo principal del desarrollo es la organogénesis y la diferenciación (Von

Versen-Hoeynck y Powers, 2007). Por ello, el crecimiento está limitado y el feto no presenta un gran aumento de peso en proporción con el que experimenta la madre. Este aumento de peso coincide con un aumento del depósito de grasa en el tejido adiposo de la madre, llegando a constituir hasta un 28% de todo el peso que gana durante la gestación (Hyten y Leitch, 1971). Este aporte extra de energía y nutrientes durante el primer periodo, permitirá el intenso intercambio de metabolitos que es demandado en la segunda etapa, así como los ajustes metabólicos necesarios para un adecuado control posterior del metabolismo de la insulina y glucemia de la madre. Durante esta primera etapa se produce un aumento del tamaño de la placenta, del volumen de líquido amniótico y la cantidad de proteína neta. Se producen variaciones hormonales que conducen a una readaptación metabólica ante la nueva situación, entre las que destaca el aumento paulatino en los niveles de insulina (Kalkhoff y col., 1970) y en la sensibilidad a esta hormona, que tiene efecto sobre procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis (Landau y Lugibihl, 1967), pudiendo así participar activamente en el control metabólico materno. Estimando la formación de nuevos tejidos en el feto, alrededor de 40 kcal/kg/día se incorporan como tejido nuevo. A esto debemos añadir los requerimientos energéticos para el mantenimiento de la actividad metabólica, que es similar en fetos pequeños y grandes, suponiendo un requerimiento energético equivalente a 90-100 kcal/kg/día para mantener una tasa normal de crecimiento y nutrición intrauterina (Battaglia y Meschia, 1978).

Durante el segundo periodo, se reduce enormemente el ritmo de ganancia de las reservas maternas, continúa el crecimiento lineal de la placenta y del líquido amniótico, y el crecimiento fetal ocurre de forma exponencial (Herrera, 1988b; Von Versen-Hoeynck y Powers, 2007; Herrera y Ramos, 2008). El balance metabólico está bien diseñado para proporcionar un continuo suministro de nutrientes, que aseguran el desarrollo fetal y placentario incluso cuando las condiciones nutricionales maternas no sean las óptimas. (Von Versen-Hoeynck y Powers, 2007).

A lo largo de este periodo, metabólicamente debemos destacar:

a) Una marcada disminución en los niveles de glucosa circulante (Metzger y Freinkel, 1987) debido a una baja biodisponibilidad de sustratos, causada por la intensa demanda metabólica del feto, que no es compensada a pesar de encontrarse activada la vía gluconeogénica por encima de los valores normales (Chaves y Herrera, 1980; Herrera y col., 1969; Zorzano y col., 1986).

b) Una gran actividad lipolítica, que conduce a un aumento de sustratos para el feto (Knopp y col., 1970) y, a su vez, a unos mayores niveles circulantes de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol. Estos AGL contribuyen a aumentar los niveles de cuerpos cetónicos circulantes, que al cruzar fácilmente la placenta (Palacín y col., 1984), alcanzan en la circulación fetal los mismos niveles que en la madre. Si la transferencia placentaria de estos ácidos grasos (AG) es limitada, sus niveles en plasma fetal serán mucho más bajos. Por otro lado, los AGL contribuyen a aumentar los niveles de glicerol, que se usarán en la gluconeogénesis, aumentando la glucosa disponible para el feto en periodos de ayuno prolongado. Por todo ello, tanto las concentraciones elevadas de cuerpos cetónicos como de glicerol contribuyen a mantener los niveles metabólicos adecuados, incluso en los periodos de ayuno prolongado.

c) Hiperlipemia, por una mayor producción endógena de triglicéridos (TG), y por una disminución en el catabolismo de las lipoproteínas, al que además contribuye el aumento de la ingesta de la madre, lo que sirve de sustrato para iniciar la formación de leche en preparación para la lactancia (Herrera y col., 1987; Ramírez y col., 1983).

#### DIABETES GESTACIONAL

En algunas mujeres no diabéticas, durante el embarazo se desarrolla una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, sucediendo que aunque en ayunas los niveles de glucosa e insulina sean normales, tras una sobrecarga de hidratos de carbono en ayunas, la glucemia se eleve por encima de valores normales. Estos cambios se acentúan más en el último trimestre de la gestación, y se incluyen como característica de la diabetes gestacional (DG) (Metzger y Coustan, 1998).

La DG se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que comienza o se diagnostica por primera vez durante el embarazo. Suele ser una condición transitoria, en la que la gestante no es capaz de producir suficiente insulina, provocando elevación de la glucemia (Metzger y Coustan, 1998). Suele diagnosticarse en el segundo trimestre, cuando aumenta la producción de hormonas antagonistas de la insulina (somatotropina coriónica) (Herrera, 1988b; Herrera y Ramos, 2008; Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009). Estas hormonas modifican la sensibilidad de los receptores periféricos de insulina, desviándose la glucosa hacia el feto y aumentando la movilización de los lípidos del tejido adiposo materno.

Las madres con DG transmiten a su descendencia una tendencia “diabetogénica” que no se manifiesta en situaciones normales, pero sí cuando se requiere un aumento de la metabolización de la glucosa. Así, factores que promueven la resistencia a la insulina parecen aumentar el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tras el parto en las madres que desarrollaron DG, mientras que existe mayor riesgo de desarrollar obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes en estadios tempranos de la vida adulta en la descendencia de madres con DG.

Las gestantes con diabetes mellitus (DM) previa al embarazo, presentan mayor riesgo de prematuridad, macrosomía, distrés respiratorio y defectos congénitos que conducen a un aumento de la mortalidad neonatal.

La DG moderada da lugar a niños con hiperplasia e hipertrofia pancreática y mayor peso al nacimiento, acompañado de aumento de la insulinemia. En situaciones severas, se induce hipertrofia con elevación temprana de la insulinemia, pero con estimulación permanente y excesiva del páncreas, afectando a su funcionamiento y conduciendo a hipoglucemia, disminución del metabolismo y macrosomía en el periodo perinatal.

Por todo esto es fundamental controlar la tolerancia a la glucosa en las gestantes. Para ello, lo más común es realizar de forma rutinaria el test de O’Sullivan (1998) entre las semanas 24 y 28, consistente en una medición de la glucemia en ayunas, una sobrecarga oral de 50g de glucosa, y una nueva medición de la glucemia tras 1 hora. Si los niveles de glucosa exceden los 140 mg/dL, el test se considera positivo. A las gestantes en esta situación se les realiza posteriormente una prueba de sobrecarga oral con 100g de glucosa y medición de la glucemia

cada hora durante un total de 3 horas. Se consideran valores normales de glucemia en esta prueba funcional 105mg/dL para la basal, 190mg/dL en la primera hora, 165 mg/dL en la segunda, y 145 mg/dL en la tercera. Si al menos dos medidas igualan o superan estos valores, la mujer será diagnosticada de DG.

#### DIETA MATERNA

Durante la gestación es recomendable aumentar ligeramente el tamaño de las raciones y el número de tomas a lo largo del día, aconsejándose 5 ó 6. La postcena, recena ó resopón (término más habitualmente utilizado en clínica) como última toma parece altamente aconsejable, sobre todo en las gestantes que suelen cenar temprano, ya que evita el bache hipoglucémico debido a la demanda fetal entre la cena y el desayuno, asegurando un buen aporte de glucosa para el feto y una protección de las reservas de grasa y proteínas maternas (Herrera, 1988b).

La alimentación deberá ser suficiente y muy variada, además de adecuada, equilibrada y simultánea. Es decir, en cada comida deben encontrarse platos que aporten la mayor variedad de hidratos de carbono, proteínas, lípidos y lo que es más importante, una alta densidad de micronutrientes y elementos bioactivos. Una ingesta adecuada asegura las sinergias y complementaciones entre nutrientes, mejora la salud digestiva de la gestante y su microbiota, aportando el mejor substrato para asegurar una óptima función inmuno-nutricional.

En el embarazo, se recomienda un ingreso calórico total aproximado de 2.500 kcal/día, con un aporte proteico de 75g/día. Las vitaminas deben aumentar un 15-30%, el folato un 100%, y el calcio y el hierro entre el 50 y el 100% (SEN, 2008). En la segunda mitad del embarazo la ingesta energética debe aumentarse aproximadamente entre un 8 y un 15% respecto de la ingesta pregestacional.

En algunas poblaciones las necesidades maternas reales de energía están disminuidas por adaptaciones fisiológicas, que incluyen reducción del índice metabólico basal, niveles de actividad, temperatura corporal y depósitos de grasas (Dumin 1987), aunque por debajo de ingresos calóricos maternos alrededor de 1.800 kcal/día el crecimiento fetal adecuado ya no estaría siempre debidamente garantizado (Charlton, 1993)

Actualmente hay cierta controversia en cuanto al aumento de las recomendaciones de ingesta de vitamina A y hierro. De hecho, la Sociedad Española de Nutrición (SEN, recientemente SEÑ) (2008) no aumenta estas recomendaciones, ya que se considera que la capacidad de absorción de hierro se aumenta en 2,5 veces respecto a la etapa pregestacional y que no hay pérdidas menstruales, además de evitar que esta suplementación pudiera interferir a su vez en la absorción de otros minerales disminuyendo con ello su biodisponibilidad.

No obstante, existe el acuerdo de prescribir durante el embarazo suplementos de hierro, yodo y folatos, considerando las características pregestacionales de la gestante, cuando pudiera existir una anemia o déficit de alguno de estos nutrientes tan esenciales previos al embarazo. Se evitarán así trastornos clínicos posteriores como consecuencia de este déficit. Los suplementos de yodo evitan el retraso mental prevenible ligado a la deficiencia de este mineral (Organización Mundial de la Salud (OMS), 1986). El suplemento de folatos asegura un

adecuado aporte de 600 µg/día, y ayuda a prevenir los defectos de cierre del tubo neural en el primer mes de embarazo, y posteriormente anemias macrocíticas e hiperhomocisteinemia (de Paz y Hernández, 2006; Varela-Moreiras y col., 2007; Hoyo y col., 2011; Greenberg y col., 2011). De cualquier modo, el hígado humano tiene una actividad dihidrofolato reductasa limitada y una baja afinidad por el ácido fólico, de modo que los grandes suplementos de folatos saturarían el sistema de metabolismo del ácido fólico, provocando la presencia de ácido fólico no metabolizado (con baja transformación a 5-metil-tetrahidrofolato (MTHF)) en sangre de forma permanente (Couto y col., 2007; Alonso-Aperte y Varela Mosquera, 2010), desconociéndose aún los efectos de sus niveles plasmáticos elevados.

El análisis DAFO (Debilidades, Amenazas, Fortalezas y Oportunidades) que caracteriza la alimentación de la gestante se indica en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Análisis DAFO sobre el estado nutricional de la gestante.

DEBILIDADES	FORTALEZAS
Aumento en los requerimientos nutricionales	Cambios metabólicos que contribuyen a la cobertura de algunos nutrientes
Dietas con insuficiente aporte de nutrientes	Alimentos funcionales como ayuda para satisfacer las necesidades nutricionales
Situaciones de especial dificultad	Suplementos farmacológicos para reducir los efectos de las carencias nutricionales
Patologías y complicaciones relacionadas con la ingesta	Planificar la gestación permite fortalecer los puntos de debilidad nutricional.
AMENAZAS	OPORTUNIDADES
Desequilibrios en el balance hídrico	Momento clave para adquisición de buenos hábitos de vida y alimentación
Ganancia de peso inadecuada	La alimentación como estrategia para paliar o mejorar algunos síntomas y complicaciones propias de esta etapa.
Desnutrición de ácido fólico y yodo entre otros	
Seguimiento de dietas restrictivas y elevado consumo de alimentos de baja densidad nutricional	
Pérdidas nutricionales en el procesado de los alimentos	
Interacción fármaco-nutriente por mala praxis en la medicación	
Exceso de la ingesta de nutrientes, superior al límite tolerable	

Adaptada de Silvestre Castelló (2013).

Aumentar demasiado el aporte de algunos nutrientes podría acarrear problemas. Así, un exceso de yodo puede originar una tirotoxicosis iatrogénica. La ingesta aumentada de vitamina A incrementa sus riesgos teratógenos (Institute of Medicine, 1990; Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009; Florido Navío y col., 2010; Ortega y col., 2010), así, consumos de vitamina A 4



veces por encima de la ingesta diaria recomendada (IDR) aumentan 5 veces el riesgo de daños fetales. Por eso, los suplementos deben contener  $\beta$  carotenos, que carecen de efecto teratogénico (Smolin y Grosvenor, 2000). El exceso de hierro produce molestias gastrointestinales en la gestante, aumenta el riesgo de macrocitosis (Rivero, 1993) y puede interferir en la absorción de otros minerales como el zinc (Olivares y col., 2010).

#### GANANCIA DE PESO

La ganancia de peso durante la gestación es un factor de riesgo específico que influye sobre el tamaño fetal. Durante el primer y segundo trimestre afecta fundamentalmente a los componentes maternos y a la placenta, y durante el tercer trimestre, al feto.

Para asegurar la gestación de un nuevo ser cuyo peso esté comprendido entre los 2,5 y los 4,0 kg, la madre debería ganar entre 11,3 y 15,8 kg (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 1990). No obstante, considerando que tanto la gestación de niños pequeños para su edad gestacional (SGA, *small for gestational age*) como la de niños grandes para su edad gestacional (LGA, *large for gestational age*) presenta graves problemas para el desarrollo de patologías en la vida adulta (Barker, 1995; Barker, 1999; Pascual-Leone y Medina, 2008; Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009; FloridoNavío y col., 2010), y que la ganancia de peso excesiva o deficiente también entraña riesgos para la madre (Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009; Florido Navío y col., 2010), se aconseja un aumento de peso durante la gestación acorde con el peso pregestacional. Así, en mujeres con exceso ponderal, la ganancia de peso recomendada se sitúa entre 6,8 y 11,3 kg, mientras que en aquellas con peso reducido, lo recomendado es un aumento de entre 12,7 y 18 kg (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 1990). En el caso de embarazos múltiples, la ganancia recomendada estará en torno a los 18 kg, dependiendo del número de fetos y del peso pregestacional (McGanity y col., 1998). También es importante tener en cuenta el ritmo de la ganancia ponderal. Se podría considerar como apropiada una ganancia de 4 kg durante las primeras 20 semanas, e incrementos posteriores de 0,4-0,5 kg/semana (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 1990; McGanity y col., 1998).

Del total del peso ganado en la gestación, el 38% corresponde a peso fetal y placentario, el 30% al aumento en el volumen materno y el líquido extracelular, el 9% es líquido amniótico y el resto a tejido materno y depósitos grasos de la lactancia (Charlton, 1993).

Al final del embarazo tienen lugar ajustes para permitir la transición desde el seno materno, pasando por el parto, a la lactancia. Esto implica cambios en la concentración plasmática de sustratos (glucosa, lípidos) y hormonas (insulina, prolactina, progesterona) en la madre. Cabe destacar también cierto grado de resistencia a la insulina. Esta situación viene determinada por la necesidad de asegurar glucosa al cerebro materno y fetal, y dirigir la glucosa a la glándula mamaria, reduciendo su utilización por otros órganos maternos (Herrera, 1988b; Herrera y Ramos, 2008; Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009). Sin embargo, si la homeostasis de la glucosa no es adecuada, pueden sobrevenir cambios que afecten de forma grave al desarrollo del feto y le predispongan a padecer diabetes en la vida adulta (Metzger y Coustan, 1998; Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009).

## CRECIMIENTO FETAL

En el año 1979, la OMS publicó algunas definiciones respecto al peso al nacer para evitar confusiones al respecto:

a) Se considera que un neonato es pretérmino cuando nace antes de las 37 semanas de gestación, a término cuando nace entre la semana 37 y la 42 y post-término cuando nace más allá de la semana 42 (OMS, 1979; Bastida, 1992; Espárrago, 1997).

b) Un neonato será considerado de bajo peso si al nacer su peso es inferior a 2,5 kg, normopeso si pesa entre 2,5 y <4 kg y de alto peso cuando iguala ó excede los 4 kg.

c) Según el grado de maduración y desarrollo, se emplean los términos de pequeño para su edad gestacional (SGA) para describir a los neonatos con parámetros de crecimiento por debajo del Percentil 10 ( $P_{10}$ ) para su edad gestacional, que no han sufrido restricción patológica en el crecimiento, apropiado para su edad gestacional (AGA, *appropriate for gestational age*) para los recién nacidos con parámetros de crecimiento entre el  $P_{10}$  y el  $P_{90}$  para su edad gestacional, o grande para su edad gestacional (LGA), para describir a los neonatos con parámetros de crecimiento por encima del  $P_{90}$  para su edad gestacional (OMS, 1979; Bastida, 1992; Espárrago, 1997).

En los neonatos con retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), el crecimiento puede clasificarse como simétrico o asimétrico, lo que proporciona mayor precisión en el conocimiento de la etiología del daño fetal (Hales y Ozzane, 2003). Aproximadamente el 75% de los casos de RCIU tienen un patrón de crecimiento asimétrico, y estas gestaciones tienen un mayor riesgo de preeclampsia severa, distrés fetal, intervención operativa y bajos índices de Apgar neonatales, comparados con los de patrón simétrico (Hales y Ozzane, 2003). Un neonato con RCIU y crecimiento simétrico es probablemente el resultado de un daño fetal temprano, debido a la exposición a sustancias químicas tóxicas, infección vírica ó anomalías del desarrollo. Todo ello resulta en una reducción proporcionada de las medidas fetales. Por el contrario, el neonato con RCIU y crecimiento asimétrico puede sufrir una reducción desproporcionada de las medidas fetales por insuficiencia útero-placentaria.

Por otra parte, muchos fetos de gestaciones complicadas con diabetes muestran un crecimiento fetal acelerado, de modo que el peso al nacer supera al normal. Esta condición se define como macrosomía si el peso del niño excede los 4 kg, aunque también se puede emplear LGA si se relaciona el peso en el momento del nacimiento con la edad gestacional (Jansson y col., 2003).

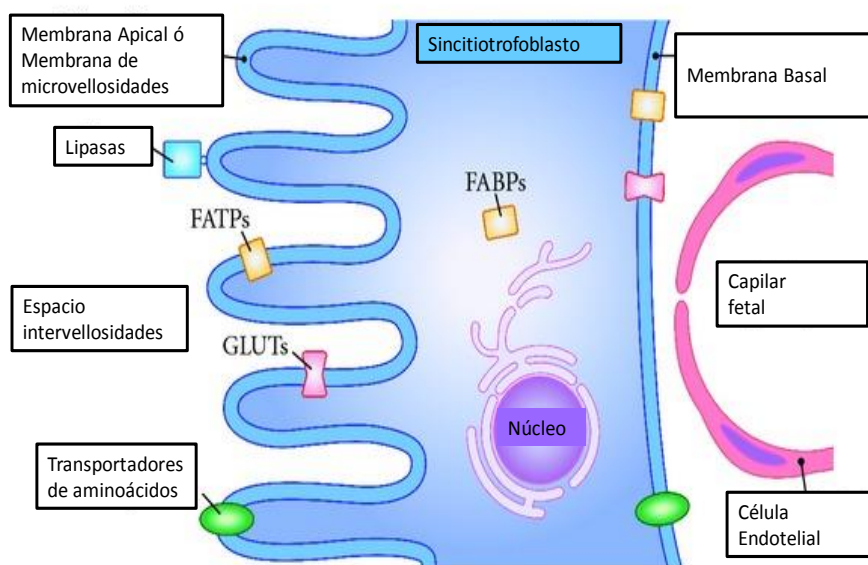
El crecimiento fetal es un proceso dinámico y complejo controlado por un amplio abanico de componentes maternos, placentarios y fetales. Como resultado de ello, la etiología del RCIU y la macrosomía es a menudo multifactorial, implicando factores genéticos y ambientales en distinto grado.

Estudios epidemiológicos realizados en distintas partes del mundo relacionan las alteraciones del patrón de crecimiento en etapas tempranas del desarrollo intrauterino con un aumento del riesgo de padecer hipertensión arterial (HTA), alteración de la tolerancia a la glucosa y DM2, resistencia a la insulina, obesidad central y síndrome metabólico (SM) en la vida adulta (Hales y Ozzane, 2003).

## PLACENTA

El crecimiento placentario supera al fetal durante las primeras semanas de gestación, hasta alcanzar un límite en el cual su aumento de tamaño se detiene. Sin embargo, el feto continúa su crecimiento a gran velocidad, gracias a que la función madurativa de la placenta sigue su evolución independientemente de su tamaño (Battaglia y Meschia, 1978). Por ello es muy importante un buen desarrollo durante la primera fase gestacional para que exista una adecuada disponibilidad de reservas durante el segundo periodo. Así, está ampliamente demostrado que además de los factores genéticos, y de forma independiente, una nutrición deficiente o inadecuada de la madre gestante incide negativamente en el desarrollo y crecimiento fetal y placentario (Young, 1981; Herrera y Lasunción, 1990), habiéndose observado que el estado de salud de la mujer es más relevante incluso que los factores genéticos como condicionante del peso de los recién nacidos en la sociedad occidental (Young, 1981).

La placenta juega un papel central en el transporte de nutrientes entre los compartimentos materno y fetal. Procesa señales enviadas desde ambos compartimentos para regular la demanda fetal y el suministro materno de sustratos, asegura sus propias demandas metabólicas y transfiere sustancias de desecho fetal a la circulación materna (Von Versen-Hoeynck y Powers 2007). La Figura 1.2 presenta de forma esquemática la estructura de la barrera placentaria.



**Figura 1.2.** Estructura del sincitiotrofoblasto y localización de algunos transportadores de nutrientes. Adaptada de Lager y Powell (2012). FABP: proteínas de unión a ácidos grasos. FATP: proteínas de transporte de ácidos grasos. GLUT: transportadores de glucosa.

La implantación y la formación de la placenta son procesos altamente coordinados que implican interacciones entre las células maternas y las embrionarias. La invasión del trofoblasto en el epitelio uterino y el remodelado de las arterias espirales uterinas es lo que asegura que la unidad feto-placentaria en desarrollo reciba el suficiente suministro sanguíneo y que exista un transporte de nutrientes y gases eficiente y una eliminación adecuada de las sustancias de desecho (Von Versen-Hoeynck y Powers 2007).

#### TRANSFERENCIA MATERNO-FETAL DE NUTRIENTES

La placenta es una membrana selectiva que condiciona, para la mayoría de los nutrientes, concentraciones diferentes en la sangre fetal que en la materna (Basset, 1986). Según Lasunción (1988) este gradiente de concentración es el motor que impulsa la transferencia neta de nutrientes desde la madre hacia el feto. En la circulación fetal, la concentración de un sustrato es función, entre otros aspectos, de su consumo por las células del ser en formación. Por tanto, la transferencia de nutrientes a través de la placenta ocupa un lugar destacado en la regulación del crecimiento en el periodo prenatal (Hernández, 1992).

Entre los factores que condicionan la capacidad de transferencia placentaria de nutrientes destacan el tamaño, la morfología y la abundancia de transportadores. El tamaño placentario afecta directamente a la capacidad de transferencia, correlacionando positivamente con el peso corporal del neonato a término en un gran número de especies. La placenta crece progresivamente a lo largo de la gestación, primero aumentando su masa y posteriormente incrementando el área de la superficie de intercambio. La mayor parte de la transferencia de nutrientes entre la madre y el feto ocurre a través de una única capa celular, que es el sincitiotrofoblasto. Los nutrientes cruzan posteriormente la membrana basal de dicha capa celular, que es adyacente al endotelio del capilar fetal (Figura 1.2). Tanto el déficit como el exceso de nutrientes durante la gestación afectan al tamaño de la placenta, aunque los efectos específicos dependen de la severidad, duración y edad gestacional en el momento de la alteración nutricional (Heasman y col., 1998). Asimismo los cambios en la morfología macroscópica y ultraestructural de la placenta tienen lugar a medida que aumenta la edad gestacional, de manera fisiológica y en respuesta a manipulaciones nutricionales o endocrinas (Stegeman, 1975; Baur, 1977; Sibley y col., 2005). Muchos de estos cambios están interrelacionados y conducen a alternaciones en la superficie, la vascularización, el tamaño de la barrera y la composición celular, todo lo cual tiene repercusiones en las características del transporte a través de la placenta (Sibley y col., 1997).

En placentas hemocoriales como la humana, donde el trofoblasto “perfora” su camino por el endometrio hasta erosionar el endotelio de los vasos uterinos y encontrarse así en contacto directo con la sangre materna (Poirier y col., 1974), el conjunto de los cambios morfológicos aumenta la capacidad teórica de difusión entre 15 y 20 veces en la segunda mitad de la gestación (Coan y col., 2004).

El flujo materno en el espacio intervillósario se establece entre las semanas 10 y 12 de la gestación (Jauniaux y col., 2000; Burton y Jauniaux, 2004). Durante el primer trimestre, antes del inicio de la llegada de sangre al espacio intervillósario, la nutrición fetal es histiotrófica, con procesos de captación de secreciones glandulares endometriales por parte

del trofoblasto (Burton y col., 2002; Burton y Jauniaux, 2001). Tras la semana 10-12 de gestación, la sangre materna está en contacto con las vellosidades y tanto la transferencia de nutrientes y gases como la eliminación de productos de desecho se llevan a cabo a través de las membranas placentarias.

Los niveles específicos de los flujos umbilical y uterino en el último periodo gestacional no se ven afectados significativamente por estrés térmico, glucocorticoides, hipoglucemia, ayuno agudo ni por manipulaciones nutricionales, situaciones, todas ellas, con repercusiones más profundas en estadios más tempranos de la gestación (Thureen y col., 1992; Carver y Hay 1995; Fowden y col., 1998; Wallace y col., 2002; Jellyman y col., 2004).

El feto debe recibir una cantidad equilibrada de nutrientes durante la última parte de la gestación. El requerimiento calórico normal cerca del término es de unas 90-110 kcal/kg/día (Institute of Medicine, 2006a, 2006b)

En la placenta humana, el intercambio materno-fetal ocurre a través de dos capas celulares que separan la circulación materna de la fetal: el sincitiotrofoblasto ó epitelio de transporte, y el endotelio que recubre el capilar fetal. Este último forma un extenso lecho microvascular continuo de células endoteliales con espacios intercelulares que restringen la permeabilidad a grandes solutos hidrófilos, pero no a solutos relativamente pequeños como los aminoácidos. El intercambio materno-fetal de aminoácidos dependerá de las propiedades de la cara materna de la membrana plasmática de las microvellosidades y de la cara fetal de la membrana basal del sincitiotrofoblasto (Tsitsiou y col., 2011) (Figura 1.2).

#### *MECANISMOS DE TRANSPORTE PLACENTARIO DE NUTRIENTES*

La mayor parte de los conocimientos sobre el transporte de nutrientes a través de la placenta en humanos procede de estudios realizados al término de la gestación. Sin embargo, hay evidencias de que el transporte placentario al inicio de la gestación puede diferir en muchos aspectos de lo que se observa al final de este período (Glazier y Jansson, 2004).

El transporte placentario está regulado por muchos factores que incluyen los gradientes de concentración, el metabolismo placentario y el flujo sanguíneo. Para la glucosa y los aminoácidos la expresión y abundancia de los transportadores de membrana son especialmente importantes en el mantenimiento de suministro de nutrientes al feto en desarrollo. Además la transferencia de lípidos a través de la placenta es dependiente de lipasas, receptores de lipoproteínas y proteínas de unión a AG (Figura 1.4).

#### Transporte de glucosa

La glucosa es la principal fuente de energía y de átomos de carbono, y el principal sustrato utilizado por el sistema nervioso fetal (Jones, 1979). El transporte de glucosa a través de la placenta es un proceso facilitado por miembros de la familia de transportadores pasivos de glucosa de la familia GLUT. Como consecuencia, está altamente influido por las concentraciones plasmáticas de glucosa materna y el gradiente de concentración entre madre y feto (Hauguel y col., 1986; Kennaugh y Hay, 1987). En placenta humana se han identificado varias isoformas de la familia GLUT, con diferente localización y características cinéticas. El

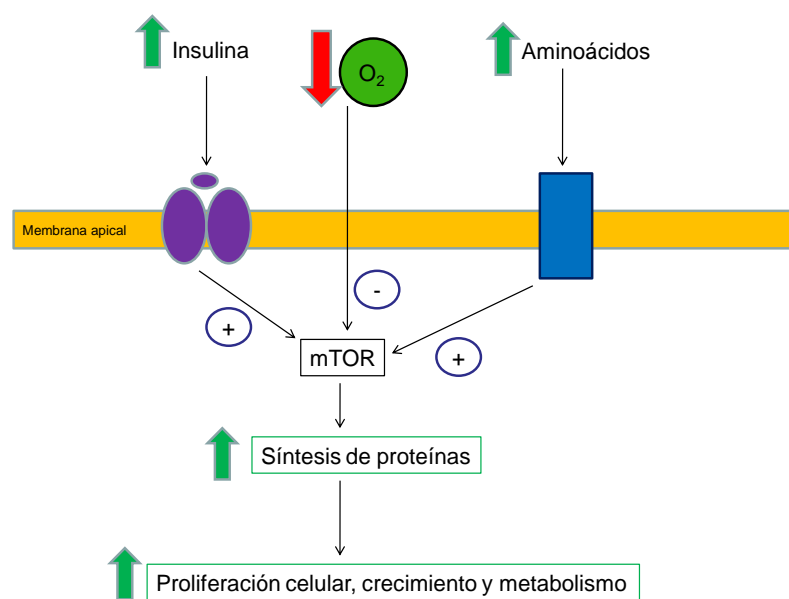
patrón de expresión de estas isoformas en el sincitiotrofoblasto varía a medida que avanza la gestación.

GLUT1 está altamente expresado a lo largo de la gestación (Jansson y col., 1993). Es un transportador independiente de insulina. Se ha identificado en las células del trofoblasto con distribución asimétrica, siendo más abundante en la cara materna (membrana de la vellosidad) que en la cara fetal (membrana basal). Esta distribución asimétrica se ha propuesto como un factor limitante en la transferencia materno-fetal de glucosa (Illsley, 2000; Larqué y col., 2013). GLUT3 está altamente expresado en la placenta al inicio de la gestación y su expresión va decreciendo hasta el final del embarazo. GLUT3 y las isoformas sensibles a la insulina GLUT4 y GLUT12, están expresadas en el sincitiotrofoblasto al inicio de la gestación (Gude y col., 2003; Ericsson y col., 2005a). A término, GLUT3 y GLUT4 se expresan únicamente en las células endoteliales y estromales, respectivamente (Hauguel de Mouzon y col., 1997; Xing y col., 1998). Estudios epigenéticos indican que la metilación del ADN regula la expresión de GLUT3 durante el embarazo, a diferencia de GLUT1 (Larqué y col., 2013; Novakovic y col., 2013).

Los niveles de glucosa en el feto al nacimiento corresponden al 70-80% de las concentraciones plasmáticas maternas (Morris y col., 1975). Así, los recién nacidos con RCIU tienen bajos niveles de glucosa en sangre de cordón (Haymond y col., 1974), lo que se corresponde con los bajos niveles basales de glucosa encontrados en madres de lactantes pequeños (Langer y col., 1986; Charlton, 1993).

La insulina y las hormonas peptídicas no atraviesan el tejido placentario. La insulina materna tiene muy poco efecto sobre la avidez del transporte de la glucosa por la placenta. El papel de la insulina en la captación de la glucosa por la placenta es muy limitado, ya que el sincitiotrofoblasto no expresa GLUT4. No obstante, la activación del receptor de la insulina en la placenta regula el sensor de nutrientes mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que a su vez regula los sistemas de transporte placentario de aminoácidos A y L, y estimula la proliferación celular y el crecimiento, promoviendo un fenotipo metabólico anabólico (Jansson y col., 2013; Larqué y col., 2013) (Figura 1.3).

La placenta también puede regular parcialmente los niveles de glucosa mediante la síntesis de glucógeno. Con anterioridad, se consideraba a la placenta incapaz de sintetizar glucógeno por carecer este órgano de glucosa-6-fosfatasa. Posteriormente se ha demostrado la presencia de esta enzima en la placenta, aunque probablemente sea producto de la expresión de un gen diferente al que codifica la glucosa-6-fosfatasa hepática (Leonce y col., 2006; Larqué y col., 2013).



**Figura 1.3** Mecanismos de señalización de mTOR y su relación con la disponibilidad de nutrientes maternos y el crecimiento fetal. Adaptado de Larqué y col. (2013)

#### Transporte de aminoácidos.

El tamaño de las proteínas es el factor limitante para su captación y transferencia a través de la placenta, por lo que no hay una transferencia placentaria relevante de hormonas peptídicas (pancreáticas o pituitarias) (Larqué y col., 2013).

En gestaciones normales el *turnover* proteico en comparación con el de una mujer no gestante se incrementa un 15% en el segundo trimestre y un 25% en el tercer trimestre (Jackson, 1987; Thompson y Halliday, 1992; Duggleby y Jackson, 2001).

Los aminoácidos constituyen un importante nutriente fetal. Son fuente de nitrógeno y carbono y se catabolizan rápidamente. Los requerimientos fetales son elevados, pues la continua división y diferenciación celular requiere una alta velocidad de síntesis proteica. Los aminoácidos proporcionan entre el 20 y el 40% de la energía requerida por la unidad feto-placentaria.

El transporte de aminoácidos libres a través de la placenta es esencial para el crecimiento fetal, y una transferencia inadecuada se asocia con RCIU. La concentración de aminoácidos libres en la placenta es superior a la de la circulación materna o fetal, lo que sugiere un papel fundamental de la placenta en este proceso (Larqué y col., 2013).

La mayoría de los aminoácidos, excepto aspartato y glutamato (Von Versen-Hoeynck y Powell, 2007), se transportan al feto de forma activa contra gradiente de concentración, produciendo niveles más altos de aminoácidos en el feto que en la madre (Kennaugh y Hay, 1987). Por ello, los niveles circulantes de aminoácidos en sangre materna juegan un papel principal influyendo en la capacidad del transporte de aminoácidos y, en último término, determinando el suministro de aminoácidos al feto (Regnault y col., 2005). Las anomalías de los



aminoácidos en sangre materna se magnificarán en el feto. Existen entre 15 y 20 sistemas de transporte de aminoácidos en la placenta humana, con especificidades de sustrato solapadas distribuidos por las membranas apical y/o basal del sincitiotrofoblasto que median el transporte de aminoácidos, proveyendo aminoácidos para el metabolismo fetal y los procesos biosintéticos así como el incremento en la “reserva” fetal de proteínas (Regnault y col., 2005; Tsitsiou y col., 2011).

Acompañando los cambios para la maduración del trofoblasto y el área de la superficie de intercambio, las capacidades de los sistemas de transporte de aminoácidos se modifican presentando diferentes patrones de expresión y parámetros de transporte a lo largo de la gestación (Malandro y col., 1994; Novak y col., 1996; Ayuk y col., 2000).

Según el tipo de aminoácidos que transportan, los sistemas se pueden clasificar en:

-Aminoácidos neutros: Se han identificado al menos 5 sistemas de transporte. El sistema A de transporte de aminoácidos media el transporte Na-dependiente de aminoácidos neutros con pequeñas cadenas laterales y está codificado por miembros de la familia Slc38, todos ellos expresados en placenta (Desforges y col., 2006). Este sistema está presente en las membranas apical y basal del sincitiotrofoblasto, con mayor capacidad en la apical (Johnson y Smith, 1998). Otro sistema Na-dependiente es el ASC, localizado en la membrana basolateral (Hoeltzli y Smith, 1989).

El sistema de transporte  $\beta$  de taurina, un  $\beta$ -aminoácido implicado en funciones fisiológicas importantes durante la vida intrauterina, está situado en la membrana apical del trofoblasto, es un sistema dependiente de sodio y cloro, y lleva a cabo el transporte activo del aminoácido (Moyer y col., 1992), consiguiendo que la concentración placentaria del mismo sea de 100 a 200 veces mayor que la que se encuentra en sangre materna (Phillips y col., 1978).

El sistema L, con sus isoformas LAT1 y LAT2 son transportadores heterodiméricos Na-independientes. Están altamente expresados y se localizan en las membranas apical y basal del trofoblasto (Kudo y Boyd, 1990; Pineda y col., 1999; Segawa y col., 1999).

El sistema L y el sistema A están regulados positivamente por el sensor de nutrientes mTOR, que a su vez está regulado por las concentraciones de insulina, oxígeno y aminoácidos (Larqué y col., 2013) (Figura 1.3).

Según Tsitsiou y col. (2011), la homocisteína se transporta por la membrana plasmática de las vellosidades placentarias mediante los sistemas de transporte A, L y  $y^+L$  de aminoácidos neutros (Figura 1.4).

-Aminoácidos catiónicos: Se han caracterizado a nivel molecular al menos 5 sistemas de transporte. El  $y^+$  Na-independiente es el principal sistema localizado en la membrana apical del trofoblasto (Ayuk y col., 2000; Jansson, 2001), mientras que el sistema  $y^+L$  representa el principal sistema a través de la membrana basal, aunque también se ha detectado en la membrana apical (Ayuk y col., 2000; Jansson, 2001).



-Aminoácidos aniónicos: aspartato y glutamato no son transferidos de la madre al feto en placenta perfundida *in vitro* (Schneider y col., 1979), aunque el transportador X<sub>AG</sub><sup>-</sup> está presente en las dos membranas del sincitiotrofoblasto (Cariappa y col., 2003). Hay una familia de transportadores aniónicos constituida por 5 miembros denominados EEAT 1-5 (*excitatory amino acid transporter*) (Arriza y col., 1994; Fairman y col., 1995) de los que 1 y 2 son los más expresados en la membrana basal de la placenta y 3 predomina en la cara apical. Estos transportadores aseguran que las concentraciones de aspartato y glutamato sean mucho mayores en el trofoblasto que en las circulaciones materna y fetal (Grillo y col., 2008).

- Sistemas acumulativos: incluyen los sistemas de transporte A y X<sub>AG</sub><sup>-</sup>. Median la captación neta de aminoácidos específicos al interior del trofoblasto.

-Transportadores de flujo (Cleal y col., 2011): Descritos recientemente. Transportan aminoácidos desde el citosol placentario a la circulación fetal, aumentando así su concentración. La expresión de LAT3 y TAT1 se ha asociado con la talla de los niños al nacimiento.

## Transporte de ácidos grasos

La transferencia placentaria de lípidos es relativamente alta en humanos, e incluso el feto puede sintetizar algunos ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos monoinsaturados

(AGM) a partir de la glucosa. Los lípidos se transfieren porque el feto necesita ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico, y adicionalmente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPCL) para asegurar la tasa de crecimiento, y por tanto, el crecimiento y maduración cerebral (Larqué y col., 2013). Se ha demostrado la captación y transferencia de AGPCL preferente por la placenta frente a la de otros AG, y sobre todo en el caso del ácido docosahexaenoico (DHA) (Gil-Sánchez y col., 2010; Larqué y col., 2011). Esta preferencia remarca la importancia de la placenta en la transferencia de AG. No se puede descartar la síntesis fetal de DHA, que sería necesaria para cubrir la gran demanda de DHA durante el embarazo (Larqué y col., 2013).

Los AG esenciales y los AGPCL son importantes para el crecimiento y desarrollo fetal. En gestaciones normales, a las 12-14 semanas se incrementa la sensibilidad a la insulina que, sin embargo, disminuye durante el resto de la gestación (Catalano y col., 1993; Ryan, 2003). Esta disminución en la sensibilidad a la insulina alcanza un pico en el tercer trimestre de gestación y resulta ser una adaptación fisiológica para asegurar la disponibilidad de glucosa y AG para el feto.

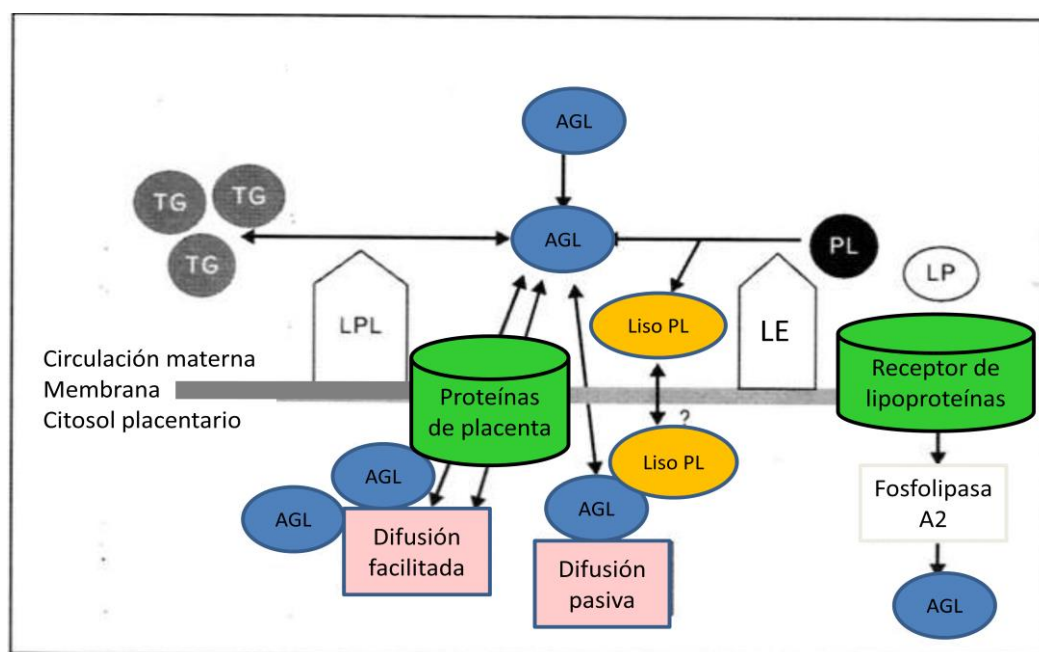
Pese al incremento de la transferencia de productos de la lipólisis a la sangre materna, su transferencia placentaria es relativamente baja (Herrera y col., 1998). Durante las etapas tempranas de la gestación los lípidos fetales derivan de los AGL y glicerol maternos que atraviesan la placenta, mientras que, posteriormente, hay un cambio gradual hacia la síntesis *de novo* en tejidos fetales (Van Aerde y col., 1998). El feto es capaz de sintetizar AGS e insaturados a partir de glucosa y cuerpos cetónicos, pero depende enteramente del transporte placentario de AG esenciales (linoleico y  $\alpha$ -linolénico). Los AG esenciales y sus derivados poliinsaturados de cadena larga (araquidónico, eicosapentaenoico (EPA) y DHA) son constituyentes esenciales de las membranas, actúan como precursores de moléculas de señalización celular, siendo araquidónico y DHA particularmente importantes para el desarrollo del cerebro y la retina (Dutta-Roy, 2000). La cetogénesis no es activa en el feto aunque los cuerpos cetónicos son transferidos a través de la placenta (Alonso de la Torre, 1992). A diferencia de lo que ocurre con los cuerpos cetónicos, los TG maternos no pueden atravesar la placenta (Shand y Noble, 1979; Coleman, 1989; Herrera y col., 1998).

La pronunciada demanda de AG y otros precursores lipídicos durante el desarrollo requiere una apropiada dotación de enzimas capaces de llevar a cabo la lipólisis, que deberán estar situadas en la interfase materno-fetal.

En la placenta se han descrito dos lipasas para la liberación de AG desde las lipoproteínas maternas circulantes: la lipoprotein lipasa (LPL) y la lipasa endotelial. La LPL tiene actividad lipasa sobre los TG, mientras que la lipasa endotelial es una fosfolipasa con baja actividad sobre los TG. Al final del embarazo, la LPL desaparece del trofoblasto, mientras que la lipasa endotelial sigue expresándose. Además, los AGL maternos circulantes pueden ser captados directamente por la placenta (Gil-Sánchez y col., 2012) (Figura 1.5).

Las lipoproteínas ricas en TG son muy importantes en la transferencia de AG esenciales al feto en desarrollo. Un sistema de transporte placentario elaborado asegura que sean suministradas al feto las cantidades adecuadas de AG procedentes de los TG de las lipoproteínas maternas. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad

(VLDL), los receptores de Apo E, la LPL placentaria, la fosfolipasa A2 y las lipasas placentarias intracelulares son componentes de este sistema (Bonet y col., 1992; Herrera, 2002b; Haggarty, 2002). La LPL está presente en la superficie materna del trofoblasto, haciendo que los AGL provenientes de la hidrólisis de los TG de las lipoproteínas VLDL estén disponibles para su transferencia (Coleman, 1989). Como resultado de ello los AG son liberados y transportados a través de la membrana del sincitiotrofoblasto (Herrera y col., 2006a). Los AGL son captados a través de mecanismos mediados, que implican proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), translocasas de ácidos grasos, y una familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) (Dutta-Roy, 2000). Aún se desconoce el mecanismo preciso por el que los miembros de la familia FATP median el paso de AG a través de la membrana (Haggarty y col., 2002; Haggarty, 2004).



**Figura 1.5.** Captación de ácidos grasos. Adaptada de Gil-Sánchez y col. (2012). AGL: ácidos grasos libres; LE: lipasa endotelial; LP: lipoproteína; LPL: lipoprotein lipasa; PL: fosfolípidos.

Los AGL son transportados al citoplasma del sincitiotrofoblasto donde se unen a FABP para interactuar con las diferentes organelas, incluyendo el retículo endoplasmático, mitocondrias, gotas de grasa y peroxisomas. En el citosol de las células del sincitiotrofoblasto, los AG pueden experimentar esterificación,  $\beta$ -oxidación o transporte hacia la sangre fetal, por difusión o con intervención de miembros de la familia FATP, a través de la membrana de la cara basal del trofoblasto (Dutta-Roy, 2000). Las FABP también parecen tener actividad en el núcleo celular, transportando ligandos específicos de factores de transcripción, como los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) (Larqué y col., 2013).

#### Transporte de colesterol

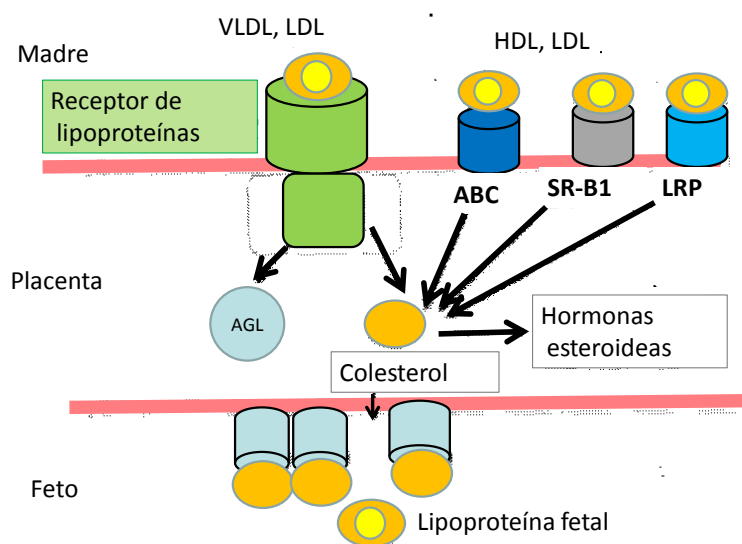
En el último trimestre de la gestación, entre el 22 y el 40% del colesterol fetal es de origen materno (Pitkin y col., 1972). El resto del colesterol placentario se emplea en la síntesis de esteroides, sobre todo de progesterona. La hipercolesterolemia materna puede conducir a lesiones preateroscleróticas, del tipo de estrías grasas, en el feto. Esto aumentó mucho el

interés por entender los mecanismos implicados en la transferencia placentaria de colesterol para diseñar un tratamiento farmacológico adecuado para estas pacientes (Napoli y col., 1997).

Las lipoproteínas maternas pueden ser captadas por los trofoblastos mediante receptores de lipoproteínas (LDL-R y VLDL-R) que requieren la endocitosis de la partícula formando lisosomas ó endosomas. El receptor regresa a la membrana y el colesterol libre se incorpora a las membranas o a las rutas metabólicas activas mediante proteínas transportadoras de esteroides (Woollet, 2011). La endocitosis también puede proveer AG al tejido placentario mediante la acción de las LPL, pero es un mecanismo aún no bien conocido (Larqué y col., 2013) (Figura 1.6).

Además del mecanismo de endocitosis, hay otros sistemas de captación del colesterol que no requieren la internalización del receptor. En este sentido, el receptor *scavenger* tipo B (SR-B1) capta el colesterol fundamentalmente de las HDL y en menor medida de las LDL ó de las LDL modificadas. La proteína LRP-1 se une a las partículas ricas en Apo E, como las VLDL. La cubilina y la LRP-2 actúan de forma conjunta para unirse a HDL y LDL, la primera uniéndose a la Apo A1, y la segunda a la Apo E y Apo B (Woollet, 2011) (Figura 1.6).

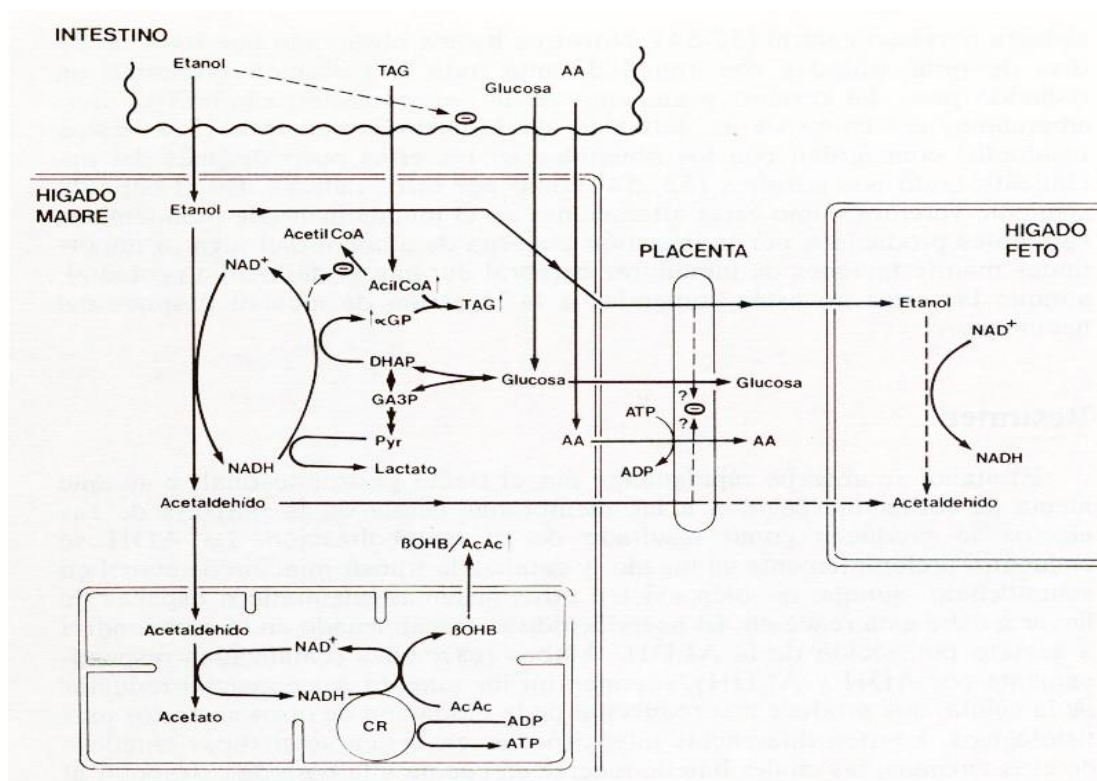
El sistema de transportadores ABC media el flujo de colesterol a través de las membranas celulares, y retira el exceso de colesterol celular (Lindegaard y col., 2008). La distribución de las diferentes isoformas de los transportadores ABC aún no está bien definida (Larqué y col., 2013). Tanto el sistema ABC como el SR-B1, parecen implicados en el flujo de colesterol hacia lipoproteínas fetales (Woollet, 2011) (Figura 1.6).



**Figura.1.6.** Mecanismos de transporte placentario de colesterol. Adaptada de Larqué y col.(2013). AGL: ácidos grasos libres; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; SR-B1: receptor *scavenger* tipo B1.

### Transporte de alcohol

El alcohol es un conocido teratógeno que atraviesa fácilmente la placenta y se acumula en la circulación fetal. Como la placenta carece de actividad alcohol deshidrogenasa (Figura 1.7), también se produce el bloqueo de diversas funciones metabólicas (Herrera y col, 1988b). El hígado inmaduro del feto es incapaz de metabolizar el alcohol con facilidad, y su presencia en la sangre y los tejidos del feto se asocia con varios defectos al nacimiento, que dependen de la dosis: cuanto más alcohol ingiera la madre, mayor es el daño potencial para el feto. El consumo de más de 3 ó 4 bebidas alcohólicas al día durante el embarazo provocaría el denominado síndrome de alcoholismo fetal, que origina malformaciones características, RCIU, retraso mental, y un elevado índice de mortalidad (Thompson y col., 2008). Para evitar los problemas fetales relacionados con el consumo de alcohol en el embarazo, debe restringirse al máximo su consumo, incluyendo las bebidas de baja graduación (Herrera y col., 1988b; López-Tejero y col., 1988; Sánchez de Medina, 2010). La ingesta de alcohol durante el embarazo lleva asociada malnutrición, bien primaria o secundaria. A medida que aumenta el consumo de alcohol, disminuye el aporte de alimentos nutritivos y saludables (Thompson y col., 2008) (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Metabolismo del alcohol en la madre y transporte placentario. Tomada de Herrera (1988).

### INFLUENCIA DEL ENTORNO INTRAUTERINO SOBRE LA SALUD EN LA INFANCIA Y EN LA VIDA ADULTA. PROGRAMACIÓN FETAL.

En tiempos de Hipócrates ya se conocía que la salud en la vida adulta puede estar determinada por los procesos de desarrollo en la vida intrauterina.

El concepto de programación en las primeras etapas de la vida pretende explicar la asociación entre los eventos que ocurren en el ambiente prenatal, la alteración en el crecimiento fetal y el desarrollo y la fisiopatología posterior (Barker y col., 2006; Barker y col., 1993; Seckl, 1998). La programación refleja la acción de un factor durante un tiempo del periodo intrauterino que afecta al desarrollo y a la organización de tejidos específicos que son vulnerables, produciendo efectos que persisten a lo largo de la vida. Las variaciones producidas por cambios en el medio pueden tener efectos diferentes, dependiendo no sólo del tipo de variación sino del momento en que se produce, ya que distintos tipos de células y tejido son sensibles en diferentes momentos (Seckl, 2004). El patrón de desarrollo en la vida intrauterina y en particular el tamaño al nacer son críticos para determinar la esperanza de vida. Cuanto más pequeño es el neonato, menos probabilidades tiene de sobrevivir tras el nacimiento y es más susceptible de sufrir enfermedades degenerativas, como la DM2, en la vida adulta (Barker, 1994).

En los tiempos primitivos, los periodos de escasez eran algo común y la especie humana seleccionó de forma natural a aquellos individuos capaces de ahorrar energía y sobrevivir con un aporte mínimo de nutrientes. Neel (1962), acuñó el término “genotipo ahorrador” para definir un repertorio de “genes ahorradores” que permitirían almacenar grasa-energía en los tiempos de abundancia para utilizarla de forma eficaz en los tiempos de carestía, y así conservar la especie. La hiponutrición materna durante el embarazo pone en marcha sistemas de adaptación que permiten la supervivencia fetal y posnatal, pero que en la sociedad moderna, en la que existe un sobreaporte energético, ya no representan una ventaja, sino que pueden ser deletéreos, incrementando el riesgo de desarrollar diversas enfermedades en la edad adulta (obesidad, DM2, y enfermedad cardiovascular (ECV)) (Corella y Ordovás, 2007; Tamargo Menéndez, 2008).

Hales y Barker (1992), propusieron la expresión “fenotipo ahorrador” basándose en la hipótesis de que cuando el entorno fetal es limitado en nutrientes, hay una respuesta adaptativa que optimiza el crecimiento de los principales órganos en detrimento de otros, y esto conduce a un metabolismo postnatal alterado para aumentar las probabilidades de supervivencia en condiciones de nutrición escasa o intermitente. La desnutrición fetal y perinatal resultaría determinante en la probabilidad de desarrollar trastornos como obesidad, DM2, HTA, osteoporosis o dislipemia en la vida adulta. Se propone que estas adaptaciones sólo son nocivas cuando la nutrición es más abundante de forma continuada en el entorno posnatal de lo que fue en el entorno prenatal. Esta propensión se puede revertir mediante una nutrición fetal adecuada, gracias a la influencia de los nutrientes sobre el ADN y la expresión de las proteínas en el recién nacido.



## FACTORES QUE INCIDEN EN LA FUNCIÓN PLACENTARIA Y QUE CONDUCEN A ALTERACIONES EN EL PATRÓN DE DESARROLLO FETAL.

En las sociedades occidentales la insuficiencia placentaria es la causa más común de RCIU, mientras que en los países en desarrollo la causa principal es la malnutrición materna. Hay muchos estudios que relacionan las alteraciones en la dieta materna durante la gestación con las modificaciones en el desarrollo fetal que pueden programar la salud del feto en la vida adulta (Hales y Barker, 1992). Los factores histiotróficos que condicionan el crecimiento y desarrollo del embrión serán clave para el crecimiento y maduración de la placenta y del páncreas fetal. Un ambiente anómalo alterará la disponibilidad de sustratos, la angiogénesis y la producción de factores hormonales maternos (Myatt, 2006), que a su vez redundará en la producción inadecuada de factores de transcripción, crecimiento y de otra índole claves para el crecimiento y maduración del nuevo ser. La reducción de la circulación materno-fetal, de la disponibilidad de nutrientes por insuficiencia histiotrófica o placentaria o por alteraciones en la cantidad y calidad de la dieta, DM ó DG materna, alteran no sólo el crecimiento del ser en formación sino su tamaño y la capacidad de las células endocrinas pancreáticas, promoviendo a largo plazo algunas incapacidades que predisponen entre otras, a enfermedades como DM2 ó SM (Barker, 1995; Barker, 1999; Serrano Ríos y col., 2010; Serrano Ríos y Gutiérrez Fuentes, 2011).

El sistema A de transporte de aminoácidos ha recibido atención especial en relación con las alteraciones en el crecimiento fetal. En tejidos placentarios y no placentarios está altamente regulado por nutrientes y hormonas como la insulina, el cortisol y la leptina (McGivan y Pastor-Anglada, 1994). En gestaciones asociadas con crecimiento placentario y fetal alterado, muchas de las hormonas que regulan el sistema A están modificadas en cuanto a sus niveles plasmáticos, secreción o número de receptores (Economides y col., 1989, Mirlesse y col., 1993, Henson y Castracane, 2000). La restricción proteica en ratas gestantes conduce a una regulación a la baja en el sistema A de transporte de aminoácidos neutros y en el transporte de aminoácidos catiónicos (Malandro y col., 1996). El RCIU se asocia con una reducción de la actividad de la  $ATPaseNa^+/K^+$ , alterando el funcionamiento de todos los sistemas dirigidos por gradientes de  $Na^+$ , como el sistema A de transporte de aminoácidos (Johansson y col., 2003). En RCIU los transportadores placentarios de lisina, leucina y taurina también están regulados a la baja (Jansson y col., 1998, Norberg y col., 1998).

Se desconocen las señales que median la reducción de la actividad del sistema A. No obstante, la malnutrición se asocia con una disminución en el flujo sanguíneo placentario, lo que podría constituir una señal para inducir alteraciones en los sistemas placentarios de transporte de nutrientes. La malnutrición materna también se asocia con cambios en los niveles circulantes de hormonas metabólicamente activas. Se puede especular que los niveles disminuidos de hormonas maternas como insulina, leptina y factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) sean una señal que relacione la malnutrición materna con los transportadores principales de aminoácidos en placenta. La placenta podría funcionar como un sensor metabólico, coordinando el crecimiento fetal con la capacidad materna de suministrar nutrientes, alternando así funciones transportadoras de la placenta. La regulación a la baja del

sistema A de transporte de aminoácidos en respuesta a la malnutrición materna avala esta hipótesis (Serrano García, 2008).

Hay evidencias de que la actividad de la LPL disminuye en gestaciones de niños pretérmino con RCIU (Magnusson y col., 2004). Se sabe que la LPL está regulada a nivel tisular por ayuno y realimentación y por insulina (Lithell y col., 1978), y que parece existir una correlación entre los requerimientos tisulares locales de AGL y las alteraciones de la actividad de la LPL (Fielding y Frayn, 1998). Esto es compatible con la hipótesis de que alteraciones en la actividad LPL placentaria contribuyen a cambios en el suministro de AGL al feto, y por tanto afectan al crecimiento fetal (Magnusson y col., 2004; Magnusson-Olsson y col., 2007).

### *Insulina*

La insulina parece afectar al transporte de glucosa en el primer trimestre de la gestación por la presencia en este periodo del transportador GLUT4 (Ericsson y col., 2005b). Se ha demostrado el efecto de la insulina sobre el transporte de glucosa a término gestacional (Acevedo y col., 2005; Anad y col., 2006), así como la relación de la expresión de la isoforma GLUT1 con la hiperglucemia y el peso placentario (Sciullo y col., 1997; Das y col., 1998). En placentas de ratones diabéticos, GLUT1 sufre una regulación a la baja en las células trofoblásticas, lo que supone un mecanismo de protección al feto a través de la placenta frente a la excesiva exposición a la glucosa (Ogura y col., 1999). Se cree que en DG, durante el último tercio de la gestación, el aumento de la transferencia de sustratos de la circulación materna da como resultado un aumento de glucosa y aminoácidos en plasma fetal, lo que estimulará la secreción de insulina que conducirá a hiperinsulinemia fetal.

La insulina también afecta al transporte de aminoácidos de distinta manera dependiendo del momento gestacional. Es interesante señalar que el sistema parece responder al efecto de la insulina a término pero no en el primer trimestre (Karl y col., 1992; Ericsson y col., 2005a).

La actividad de la LPL es uno de los pasos limitantes en la captación placentaria de AGL y correlaciona positivamente con el tamaño fetal o con los depósitos de tejido adiposo en el feto (Magnusson-Olsson y col., 2006). Se ha observado un incremento de la actividad LPL en medio hiperglucémico en un sistema de explantes placentarios con insulina (Elchalal y col., 2005). Hay evidencia de la alteración de la expresión de la isoforma hepática citoplasmática de FABP en las placentas de gestaciones complicadas con diabetes, demostrando la capacidad de la insulina de regular la transferencia de AGL (Magnusson y col., 2004).

Se puede concluir que el sincitiotrofoblasto es sensible a la concentración de sustratos y a insulina, ya que ésta estimula la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos, el transporte de glucosa y la actividad de la LPL. La regulación de los transportadores y enzimas placentarios por la insulina parece ser más activa en la segunda mitad del embarazo, cuando la unidad feto-placentaria es más sensible a factores reguladores, debido a la variación en las proteínas transportadoras presentes y a la expresión y localización del receptor de insulina.

Por otro lado parece más probable que la insulina materna y no la fetal regule la función transportadora trofoblástica en el primer trimestre, cuando los receptores de insulina se localizan principalmente en la membrana apical en contacto con la sangre materna, y a partir



del segundo trimestre, los receptores parecen desplazarse a la cara basal del trofoblasto, en contacto con el endotelio capilar fetal. En situaciones de RCIU tanto el número de receptores placentarios (Potau y col., 1981) como los niveles fetales de insulina están reducidos, mientras que las concentraciones maternas no se alteran (Economides y col., 1989; Chellakooty y col., 2004).

#### *Factores de crecimiento IGF-1 e IGF-2*

Los IGF regulan procesos de proliferación y diferenciación en múltiples tipos celulares y son capaces de ejercer los efectos metabólicos característicos de la insulina, pero a diferencia de ésta, se sintetizan en la mayoría de los tejidos del organismo (Cohick y Clemmons, 1993). Sus efectos biológicos están regulados por receptores de membrana específicos. También son reguladores importantes del crecimiento fetal. Se ha sugerido que los ligandos de los factores IGF-1 e IGF-2 pueden mediar este efecto, promoviendo, al menos en parte, el correcto desarrollo y función placentaria. En otros tejidos, los efectos de los IGF sobre el metabolismo, proliferación y diferenciación están mediados por su interacción con el receptor de IGF-1 (Forbes y Westwood, 2008).

La expresión de IGF-1 e IGF-2 y la relación entre los IGF y las proteínas de unión a IGF está reducida en respuesta a la restricción nutricional. Los niveles de los IGF tienen correlación directa con el grado de ramificación de las vellosidades e inversa con el grosor de la barrera trofoblástica (Constância y col., 2002; Sibley y col., 2004). La concentración plasmática de IGF-1 está modificada en gestaciones humanas complicadas con alteraciones en el crecimiento intrauterino (Holmes y col., 1997; Lauszus y col., 2001). En ratas gestantes con dietas bajas en proteínas el nivel plasmático de IGF-1 está significativamente disminuido (El-Khattabi y col., 2003). Se puede especular que la disminución de niveles maternos de hormonas como insulina, IGF-1 o leptina sea una señal que relacione la malnutrición proteica materna con los transportadores principales de aminoácidos en la placenta. IGF-2 es el principal modulador del tamaño placentario. Se expresa abundantemente en todos los tipos celulares placentarios derivados del cigoto (Lee y col., 1990, Redline y col., 1993).

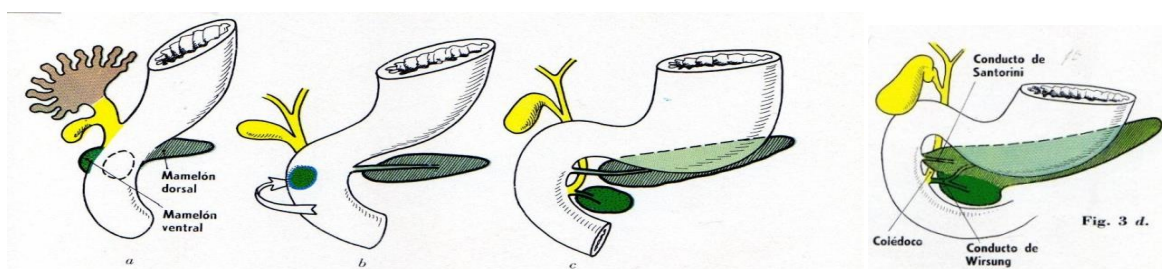
En conclusión, la eficiencia placentaria está determinada por muchos factores que incluyen el área de superficie y el grosor de la barrera de intercambio, el flujo sanguíneo a través de la vasculatura uterina y fetoplacentaria y el número y actividad de las proteínas transportadoras de las membranas plasmáticas trofoblásticas. También deben mencionarse los factores nutricionales y endocrinos que alteran la síntesis y el metabolismo de nutrientes y hormonas por parte de la placenta, y que influyen en el balance y en las cantidades absolutas de nutrientes específicos suministrados al feto.

#### **DESARROLLO DEL PÁNCREAS**

El páncreas es un órgano fundamental para nuestra economía. Ontogénicamente se desarrolla a partir de células progenitoras endodérmicas multipotentes que por efecto de algunos factores organizan células acinares (exocrinas), ductales y endocrinas. En el ser humano se origina entre las semanas 5 y 6 de gestación, observándose ya en la semana 11 los islotes bien delimitados. La producción de insulina es neta en la semana 20 (Solére y Haegel, 1970). En este momento ya se definen 4 tipos células endocrinas: células  $\alpha$ , productoras de

glucagón, células  $\beta$ , productoras de insulina, células  $\delta$ , productoras de somatostatina y células PP, productoras de polipéptido pancreático. Al final de la gestación, la proporción de células pancreáticas reproduce las características del páncreas adulto, en el que el 70-80% son  $\beta$ , el 15-20% son  $\alpha$ , el 5% son  $\delta$ , y menos del 2% son PP. Puede concluirse que es un órgano activo al final del primer trimestre, y con un papel decisivo ya en el cuarto mes de embarazo.

El tejido endocrino deriva de las células ductales del epitelio pancreático primigenio y se forma por neogénesis. Después, estas células forman racimos adheridos al epitelio ductal y la vascularización invade los territorios inmaduros, que co-expresan diferentes hormonas pancreáticas y neuropéptidos, convirtiéndose posteriormente en islotes de Langerhans (Reusens y Remacle, 2006). En el páncreas humano se definen dos partes: una dorsal y otra ventral, que en consonancia con el movimiento del duodeno, migra y se fusiona con la primera (Solère y Haegel, 1970; Poirier y col., 1974b) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Desarrollo del páncreas. Tomada de Poirier y col.(1974).

En la diferenciación de células primordiales a células endocrinas participan diferentes factores de transcripción y de crecimiento. Así, la especialización de las células  $\beta$  se canaliza fundamentalmente por el factor de transcripción PDX-1, que también interviene en la maduración de células  $\beta$  y en el control de la expresión del gen de la insulina (Sander y German, 1997), y que a su vez depende de otros factores de transcripción (Hediger y col., 2000). Los IGF se expresan en el estroma pancreático adyacente al epitelio ductal, y contribuyen particularmente a la formación de las diferentes células endocrinas y a la expansión, especialización, crecimiento y maduración de los islotes, y por tanto, a la producción de insulina. La masa de células  $\beta$  depende del equilibrio entre división, crecimiento y muerte por apoptosis, condiciona la producción de insulina y la adaptación de las células  $\beta$  a diferentes condiciones ambientales. La formación o no de células es un mecanismo típico del periodo prenatal, mientras que en el adulto los mecanismos adaptativos afectan, más que al número, al tamaño celular. (Álvarez Escolá y Escrivá Pons, 2008).

## METABOLISMO LIPÍDICO

Los lípidos, debido a su insolubilidad en medio acuoso deben ser transportados en el torrente circulatorio unidos a ciertos componentes proteicos, formando complejos macromoleculares denominados lipoproteínas.

En las lipoproteínas existen variaciones en la composición tanto lipídica como proteica, lo que condicionará sus propiedades físico-químicas. Las lipoproteínas se pueden clasificar, entre

otras formas, atendiendo a la densidad de flotación cuando son sometidas a un proceso de ultracentrifugación en gradiente de densidad, distinguiéndose cuatro grupos principales: VLDL, LDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), y HDL (Gómez Gerique, 1988). Como en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas está todo muy interrelacionado, es mejor considerar las lipoproteínas y sus subclases para optimizar el perfil lipídico, que prestarle atención a una o dos lipoproteínas, como se hacía anteriormente (Kwiterovich, 2000).

Se han definido diferentes subpoblaciones de VLDL, IDL y LDL atendiendo a algunas características fisicoquímicas como densidad, tamaño, carga y contenido en lípidos y lipoproteínas. En personas sanas hay al menos dos tipos de VLDL, las VLDL 1, más grandes, y las VLDL 2, más pequeñas, así como dos tipos de IDL. La mayoría de las diferencias de tamaño entre VLDL e IDL se deben al “core” de lípidos esterificados, ya que en estas lipoproteínas la capa de fosfolípidos (PL)/colesterol/apolipoproteínas (apo) tiene un espesor constante. En comparación con las VLDL más grandes, las VLDL pequeñas y las IDL están enriquecidas en colesterol esterificado (CE), deplecionadas en TG y tienen menor relación de Apo E y CE frente a Apo B (Berneis y Krauss, 2002).

También se pueden encontrar distintas subclases de LDL. Campos y col. (1992) hablan en el *Framingham Offspring Study* de 7 clases, LDL 1 a LDL 7, que se diferencian en su intervalo de densidad teniendo el mayor las LDL 1 y el menor las LDL 7. La presencia de LDL 3 y LDL 4 como subclases secundarias se asocia con altos niveles de colesterol unido a LDL (LDLc), y la presencia de niveles bajos de LDL se asocia con niveles altos de TG.

**Tabla 1.2.** Características de las principales lipoproteínas.

	QM	VLDL	LDL	HDL
<b>Tamaño (A)</b>	750-10.000	300-800	210-220	75-100
<b>Densidad (g/mL)</b>	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,063	1,063-1,210
<b>Movilidad EF</b>	Origen	Pre $\beta$ ( $\alpha_2$ )	$\beta$	$\alpha_1$
<b>Origen</b>	Intestino/Hígado	Hígado	VLDL	Hígado/Intestino
<b>Función</b>	Transporta TG exógenos	Transporta TG endógenos	Transporta colesterol a células periféricas	Transporte reverso de colesterol al hígado
<b>Apolipoproteínas</b>	B48, A1, A2, C, E	B100, C, E	B100	A1 A2, C

EF: electroforesis, HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, QM: quilomicrones, TG: triglicéridos, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Se han definido tres rutas principales en el metabolismo lipoproteico (Figura 1.9):

1. Transporte de la grasa dietética o exógena hasta el hígado
2. Transporte hepático o de la grasa endógena a los tejidos periféricos
3. Transporte reverso del colesterol.

Estas rutas son interdependientes, y cualquier anomalía en una de ellas influirá en la función y productos de las otras dos. Las mutaciones en las moléculas transportadoras o receptores pueden llevar a una acumulación de colesterol y/o TG, y a una modificación en el proceso normal de transporte reverso del colesterol y metabolismo del colesterol (Kwiterovich, 2000).

## 1. TRANSPORTE DE LA GRASA DIETÉTICA O EXÓGENA HASTA EL HÍGADO

### ABSORCIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA:

Las grasas de la dieta son sustituidas mayoritariamente por TG, colesterol (preferentemente no esterificado) y PL, llegan al intestino delgado en forma de dispersión grosera. Debido a la acción de la secreción biliar y de los movimientos intestinales, las partículas de grasa se dividen en otras menores dando lugar a una dispersión fina sobre la que actúan diversas enzimas pancreáticas (lipasa, colesterol esterasa, fosfolipasa A2) liberando componentes de los TG, CE y PL, que en presencia de colesterol y sales biliares originan micelas que contactan con los enterocitos produciéndose su absorción.

### SÍNTESIS DE QUILOMICRONES (QM):

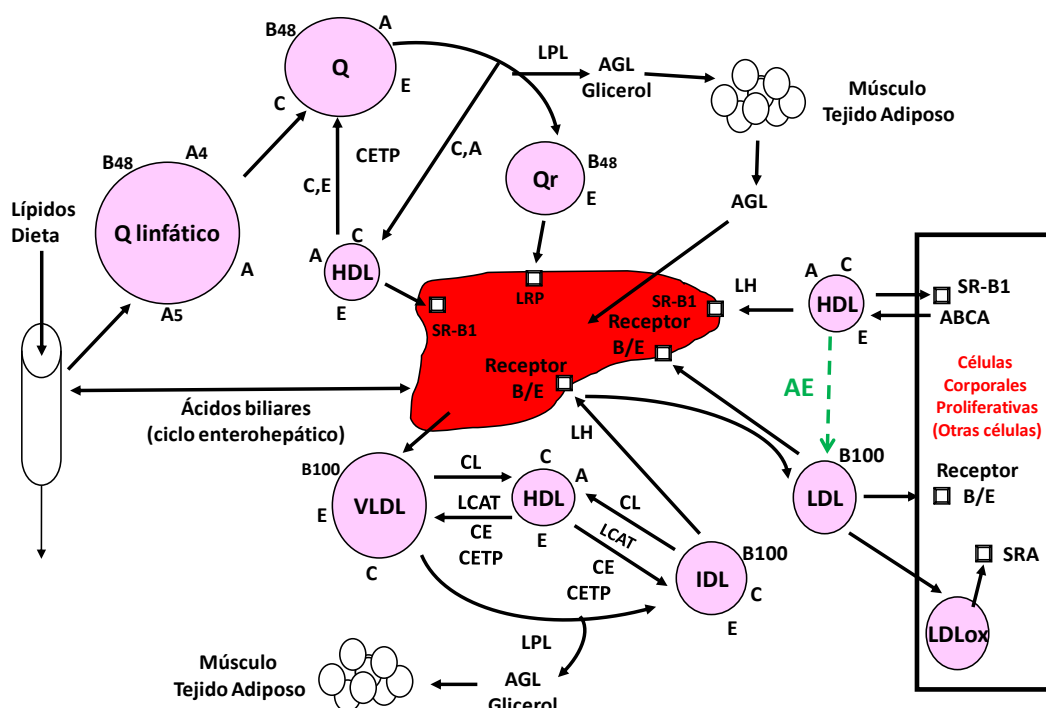
Los enterocitos ensamblan los lípidos reesterificados procedentes de la absorción intestinal (CE y TG) con una cubierta polar constituida por PL, colesterol no esterificado y proteínas sintetizadas por los propios enterocitos como Apo B48, Apo A1 y Apo A2 fundamentalmente, formándose los QM nacientes que pasan a la linfa (Friedman y Cardell, 1972). Durante su paso por el conducto intestinal y posteriormente en el plasma, estas partículas sufren un proceso de maduración en el que entran en contacto con las HDL y adquieren Apo E y Apo C (Green y col., 1979).

La Apo C2 permitirá más tarde el reconocimiento de los QM por parte de la LPL endotelial y la Apo E del hígado (Figura 1.9).

### CATABOLISMO DE LOS QM:

Ya en el torrente sanguíneo los QM "maduros", a su paso por el tejido adiposo y muscular, sufren la hidrólisis de los TG que transportan como consecuencia de la activación de la LPL por la Apo C2 (Fielding y Havel, 1977), originándose AGL, glicerol y QM residuos ó QM remanentes. Estos AGL procedentes de los TG transportados por los QM son accesibles para su almacenamiento en el tejido adiposo como TG, o para su utilización como fuente de energía en el tejido muscular.

A medida que los QM pierden los TG, quedan con un exceso de material en su superficie, pudiendo originar partículas con características semejantes a HDL nacientes (HDLn) para mantener su conformación esférica, (Tall y col., 1979) o ser transferidas a la HDL 3 para formar HDL 2 (Patsch y col., 1978). Los QM remanentes, que contienen Apo E, Apo B48, CE y algunos residuos de TG, ya no son degradables por la LPL y tienen un vida plasmática muy corta, siendo rápidamente retirados de la circulación por los receptores hepáticos de remanentes, conocidos como proteínas receptora parecidas a LDL (LRP, *LDL-like receptor protein*) (Carrella y Cooper, 1979; Kwiterovich, 2000).



**Figura1.9.** Principales rutas del metabolismo lipoproteico. ABC: transportador “ATP” binding cassette, AE: arilesterasa, AGL: ácidos grasos libres, apo: apolipoproteína, CE: colesterol esterificado, CETP: complejo de transferencia de ésteres de colesterol, CL: colesterol libre, HDL: lipoproteínas de alta densidad, IDL: lipoproteínas de densidad intermedia, LCAT: lecitin colesterol acil-transferasa, LDL: lipoproteínas de baja densidad, LDLox: LDL oxidadas, LH: lipasa hepática, LPL: lipoprotein lipasa, LRP: proteína receptora de quilomicrones parecida a LDL, Q: quilomicrones, Qr: quilomicrones remanentes, SRA: receptor *scavenger* tipo A, SR-B1: receptor *scavenger* tipo B1, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

## 2. TRANSPORTE HEPÁTICO O DE LA GRASA ENDÓGENA A LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS

La síntesis de colesterol en el organismo tiene lugar preferentemente en el hígado. Por otro lado los AGL, además de proceder de la grasa de la dieta o del tejido adiposo, pueden ser formados *de novo* en este órgano. Tanto el colesterol como los AG pueden ser sintetizados a partir de acetil CoA, que a su vez se puede obtener de los macronutrientes de la dieta.

### TRANSPORTE DE LOS LÍPIDOS ENDÓGENOS EN FORMA DE VLDL:

Las VLDL nacientes ricas en TG se sintetizan y secretan por el hígado en un proceso que requiere Apo B100. También contienen colesterol no esterificado, PL, Apo E y Apo C, aunque su contenido en estas últimas no es el definitivo (Nesstrucck y Rubinstein, 1976). Al igual que ocurría con los QM, las VLDL deben sufrir un proceso de maduración con el fin de adquirir el contenido necesario de Apo C2 para ser sustrato de la LPL. Igualmente en este proceso interviene la fracción HDL responsable de aportar esta Apo, (Chajek y Eisenberg, 1978) además

de intervenir en la esterificación del colesterol transportado por las VLDL (Nestel y col., 1979). Este proceso ocurre por un intercambio de colesterol libre y CE, interviniendo la enzima lecitina-colesterol-acil-transferasa (LCAT), el complejo de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (Ha y col., 1981) y la proteína transportadora de TG (Rajaram y col., 1980).

La LPL endotelial actúa sobre las VLDL de forma similar a como ocurría en los QM, con la Apo C2 como cofactor. Durante la degradación de las VLDL el exceso de material de superficie se transfiere a las HDL, llegando un momento en el que las VLDL ya no son degradables por la LPL. Esto resulta en la producción de remanentes de VLDL más pequeños, y por último IDL. Las IDL contienen TG en cantidades reducidas y conservan la mayor parte de la Apo E. Pueden seguir dos vías metabólicas distintas: algunas IDL se retiran por la interacción de Apo E con el receptor B/E en la superficie del hígado, o los TG de IDL se pueden hidrolizar más adelante por la lipasa hepática (LH) para producir LDL por degradación de sus TG residuales y la eliminación de sus apolipoproteínas (Apo E y Apo C), proceso en el que interviene la triglicérido-lipasa hepática (Nozaki y col., 1986) (Figura 1.9).

Las VLDL pequeñas son ligandos más efectivos para los receptores LDL que sus homólogos mayores. Como la Apo B no parece estar en una conformación de competencia con el receptor con las VLDL grandes ricas en TG, el ligando para el receptor putativo parece ser la Apo E, mientras que la Apo C3 jugaría un papel inhibitor interaccionando con la Apo E o desplazándola. La LRP está involucrada en la captación de QM y VLDL remanentes. Se ha demostrado el papel del proteoglicano heparán-sulfato en la captación de lipoproteínas mediada por Apo E y LPL, así como que la Apo B48 mediaría la unión de lipoproteínas ricas en TG a un receptor de monocitos-macrófagos.

Recientemente se ha señalado a una Apo minoritaria presente en las VLDL, la Apo A5, como factor importante en el metabolismo de estas lipoproteínas. El gen que la codifica se encuentra en un agrupamiento de genes que participa en diversas fases del metabolismo lipídico, como el transporte reverso del colesterol y metabolismo postprandial de lipoproteínas, y parece estar asociado con la lipemia familiar combinada y el riesgo cardiovascular (RCV). Tiene un importante papel en la homeostasis de los TG, participando en la hidrólisis de VLDL, la captación de lipoproteínas remanentes y la disminución de la síntesis y liberación de VLDL. Se ha sugerido que la Apo A5 acelera la hidrólisis de las lipoproteínas ricas en TG, facilitando su interacción con la LPL unida a proteoglicanos (Lookene y col., 2005; Merkel y col., 2005), con la consiguiente estimulación de la lipólisis de TG y la reducción de sus valores.

En un estudio realizado en voluntarios sanos de China (Zhao y col., 2006) se observó que la concentración de Apo A5 guarda una relación inversa con los valores de TG y directa con los de colesterol transportado por las HDL (HDLc). Por el contrario, en otro trabajo realizado en pacientes hipertriglicéridémicos y normolipémicos, se observó que las concentraciones de Apo A5 estaban notablemente elevadas en los primeros comparados con los controles (Schaap y col., 2006). Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios (Vaessen y col., 2006; Talmud y col., 2006; Alborn y col., 2007). Dallinga-Thie y col. (2006) señalan que el papel de la Apo A5 es mínimo en el metabolismo de los TG en pacientes con DM2 comparado con el de la Apo C3.

## METABOLISMO DE LAS LDL:

Estas partículas, contienen casi exclusivamente Apo B100 y son las encargadas de transportar el colesterol a la mayoría de las células del organismo (Parks y Bullock, 1987). El reconocimiento de las LDL se realiza por medio de los receptores B/E específicos de LDL o mediante pinocitosis (Anderson y col., 1978) (Figura 1.9). Las LDL son internalizadas por las células donde se hidroliza el CE mediante la colesterol esterasa lisosomal, liberando el colesterol libre, cuya concentración celular se va a regular según Brown y Goldstein (1984) mediante tres puntos de control:

síntesis de nuevos receptores específicos para LDL,

síntesis de colesterol endógeno,

formación de CE para su almacenamiento por activación de la acil colesterol-acil transferasa hepática (ACAT), aunque su actividad en el hombre es débil.

Las LDL son metabólicamente heterogéneas y algunos componentes se retiran antes que otros. La transformación plasmática inicial es debida al intercambio intra-extravascular y al catabolismo de las LDL. En estudios con individuos hipertrigliceridémicos, se ha sugerido que las LDL pequeñas y densas se aclaran del plasma en gran parte por rutas independientes de los receptores. La unión aumentada a sitios independientes del LDL-R, como ocurre en la pared arterial, es un proceso mediado en parte por los proteoglicanos de la superficie celular, y podría ser responsable del mayor potencial aterogénico de las LDL pequeñas y densas.

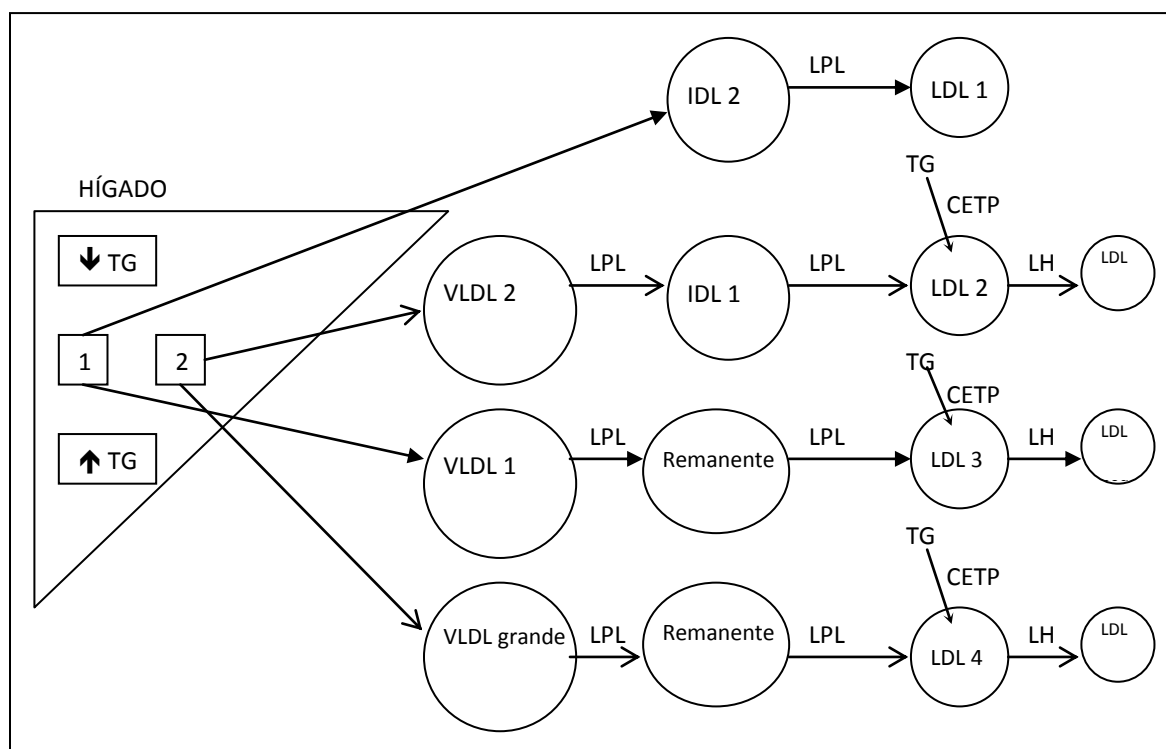
La totalidad de las partículas que contienen Apo B pueden ser secretadas por el hígado. Con niveles bajos de TG, una porción significativa de Apo B es liberada como IDL o LDL, mientras que a niveles de TG normales o elevados más del 90% de la Apo B se secreta como VLDL. Esto demuestra la existencia de diferentes vías para la producción de diferentes formas de LDL.

La Figura 1.10 muestra que la variación en la disponibilidad de TG determina las propiedades de las lipoproteínas primarias producto de secreción. Este esquema se basa en transiciones discretas que ocurren entre la producción hepática de partículas pequeñas pobres en TG y partículas grandes ricas en TG. Esto concuerda con el concepto de ensamblaje en dos fases de partículas ricas en TG implicando la fusión de una gotita lipídica con un “core” que contiene Apo B.

## DEFECTOS EN LA VÍA ENDÓGENA.

Los niveles elevados de VLDL se asocian a sobreproducción de VLDL hepática, conduciendo a una hipertrigliceridemia, que se puede exacerbar por baja actividad de la LPL o por niveles elevados de Apo C3 (inhibidor de LPL). La hipertrigliceridemia endógena suele acompañarse de varias anomalías lipoproteicas, entre las que se encuentran el aumento de IDL y VLDL remanentes, elevación de QM remanentes y LDL pequeñas y densas, junto con niveles disminuidos de HDL.





**Figura 1.10.** Posibles vías de formación de las subclases LDL. Adaptado de Berneis y Krauss (2002). CETP: complejo de transferencia de ésteres de colesterol, IDL: lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: lipoproteínas de baja densidad, LH: lipasa hepática, LPL: lipoprotein lipasa; TG: triglicéridos, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

Muchos expertos creen que los síndromes caracterizados por LDL pequeñas y densas son, en conjunto, la causa reconocida más común de enfermedad coronaria. Además de la hiperlipemia familiar combinada y la hiperapobetalipoproteinemia, hay otros tres síndromes por LDL pequeñas y densas: LDL subclase patrón B, hipertensión dislipémica familiar y el SM. Muchas características asociadas a estos síndromes incluyen hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, HTA y niveles bajos de HDLc. Una gran parte de estos pacientes también tiene aumentada la grasa abdominal o visceral, que promueve la resistencia a la insulina y la elevación de los AGL, lo que lleva a un aumento de la Apo B plasmática secundaria a la sobreproducción de VLDL y Apo B en el hígado, así como niveles elevados de LH. Estos cambios resultan en aumento de TG y LDL pequeñas y densas, y disminución de HDLc.

#### INFLUENCIAS GENÉTICAS Y AMBIENTALES PARA EL FENOTIPO DE LDL PEQUEÑAS Y DENSAS

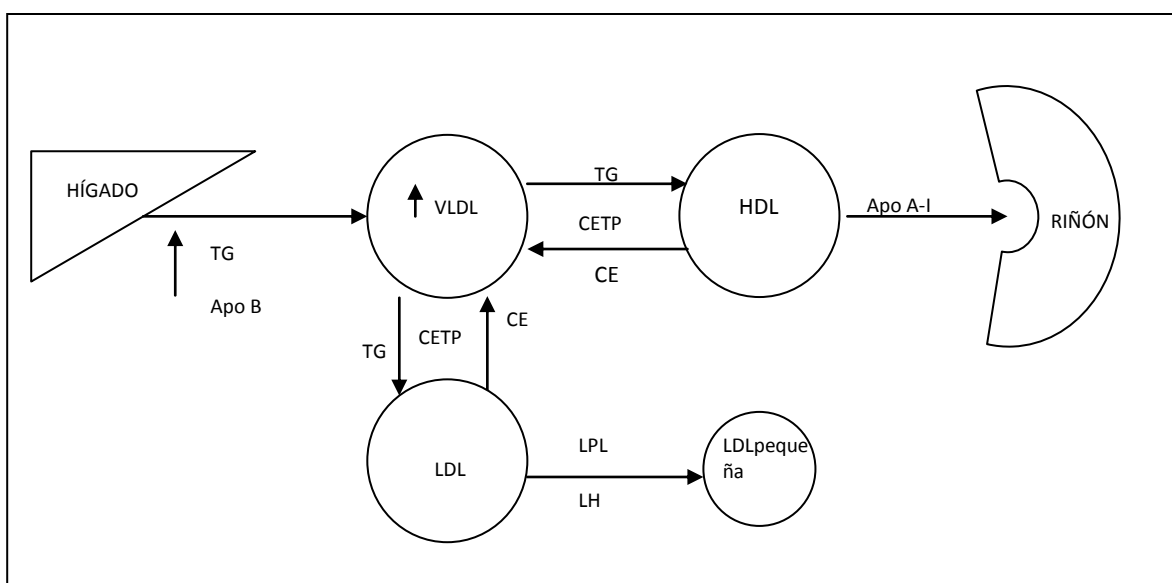
La presencia de LDL pequeñas y densas concuerda con herencia autosómica o codominante para el fenotipo de patrón B con diversos efectos poligénicos y aditivos. Se ha confirmado la asociación del fenotipo de patrón B a la región del locus del gen del LDL-R en el brazo corto del cromosoma 19. En estas familias también se ha observado asociación a zonas cercanas a otras regiones genéticas: el agrupamiento de genes Apo A1/Apo C3/Apo A4 en el



cromosoma 11, CETP en el cromosoma 16 y el gen de la Mn-superóxido dismutasa (SOD) en el cromosoma 6. También se ha encontrado asociación del gen de la Apo B con el tamaño de LDL y niveles plasmáticos de TG, HDLc y Apo B, así como del gen de la LH y el polimorfismo de la ApoE con el tamaño de las LDL (Austin y col., 1998; Topic y col., 2008). Estos resultados sugieren que hay muchos genes implicados en la determinación del tamaño de las partículas LDL principales del plasma y que el mecanismo genético responsable difiere en cada familia afectada.

Se ha estimado la heredabilidad del tamaño de las LDL en un 35-45%, lo que da mucha importancia a los factores ambientales. Además de la edad y el género se ha demostrado efecto sobre el tamaño de las LDL por parte de la grasa abdominal, uso de estrógenos y anticonceptivos orales. Estudios nutricionales de intervención han mostrado que la variación en la grasa de la dieta y los hidratos de carbono pueden influir de manera importante en el fenotipo de LDL pequeñas, y contribuyen a variaciones en la distribución del tamaño de las LDL (Kim y col., 2012; Jones y col., 2012).

En vista de la estrecha relación entre la variación en los niveles de TG y el tamaño de las LDL, los cambios metabólicos asociados con el patrón B, incluyendo el aumento de VLDL e IDL, disminución de HDL y resistencia a la insulina, las LDL pequeñas y densas se han incluido en la lista de anomalías que definen el SM (Berneis y Krauss, 2002).



**Figura 1.11.** Esquema de formación de LDL pequeñas y densas. Tomado de Kwiterovich (2000). CE: colesterol esterificado, CETP: complejo de transferencia de ésteres de colesterol, HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, LH: lipasa hepática, LPL: lipoprotein lipasa, TG: triglicéridos, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

### 3. TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL

La eliminación efectiva del exceso de colesterol libre se retira de las células periféricas, como los macrófagos, mediante la transferencia de colesterol a través de la membrana celular por el transportador ATP Binding Cassette tipo 1 (ABC1), donde es captado por las partículas de HDL. Éstas se sintetizan principalmente en hígado e intestino, aunque se ha demostrado su producción en prácticamente todas las células del cuerpo. También se ha señalado la producción de HDL en el metabolismo de los QM cuando éstos han perdido gran parte de sus TG (Tall y col., 1979). Consisten sobre todo en PL y Apo A1, estando muy empobrecidas en colesterol. Forman un grupo muy heterogéneo de partículas, aunque comparten el hecho de ser las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad.

#### MOLÉCULA DE TRANSPORTE ABC1:

La transferencia de colesterol desde el interior de las células extrahepáticas a través de la membrana celular a las partículas de HDL en el plasma durante el transporte reverso del colesterol ocurre en virtud de la proteína transportadora ABC1. Perteneciente a una familia de proteínas que median el transporte de moléculas a través de la membrana celular, consta de 12 dominios que atraviesan la membrana celular, así como una zona altamente hidrofóbica o región de unión, donde el colesterol se puede transportar al exterior de la célula. La proteína transportadora ABC1 se descubrió como resultado de un estudio genético en la enfermedad de Tangier, una enfermedad recesiva caracterizada por la ausencia de Apo A1 y HDLc, exceso de depósitos de colesterol en amígdalas, córnea, hígado, bazo y médula ósea, y aterosclerosis prematura (Kwiterovich, 2000).

Las HDL son sintetizadas como partículas helicoidales ricas en proteínas (Apo A1, Apo A2, Apo C y Apo E), PL y colesterol no esterificado. Se originan a través de la síntesis hepática directa de sus componentes y probablemente a partir de la reorganización del material de superficie de los QM (y de las VLDL) que tiene lugar como consecuencia de su lipólisis por la LPL. Las partículas HDL son de pequeño tamaño, forma discoidal y muy pobres en lípidos no polares. Durante su metabolismo van enriqueciéndose en CE procedente de la membrana y del interior de determinadas células y de una pequeña cantidad de TG, además de intercambiar lípidos y Apos con otras lipoproteínas. Como consecuencia de estos intercambios va disminuyendo su densidad y aumentando su tamaño, adquiriendo las formas que se han denominado HDL 3, HDL 2 y HDL 1 (Nichols y col., 1981).

Las HDL intervienen en el transporte reverso de colesterol (Miller y Miller, 1975), ya que transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su degradación y excreción en forma de ácidos biliares (Figura 1.9). Además, el aclaramiento de los TG del plasma está relacionado con los niveles plasmáticos de HDL (Kekki, 1980).

#### PARAOXONASA-1

Uno de los aspectos más novedosos de las HDL es su papel no sólo como molécula que interviene en el transporte reverso del colesterol, sino en la protección antioxidante propia y de otras lipoproteínas, fundamentalmente LDL y VLDL (Canales y Sánchez-Muniz, 2003).

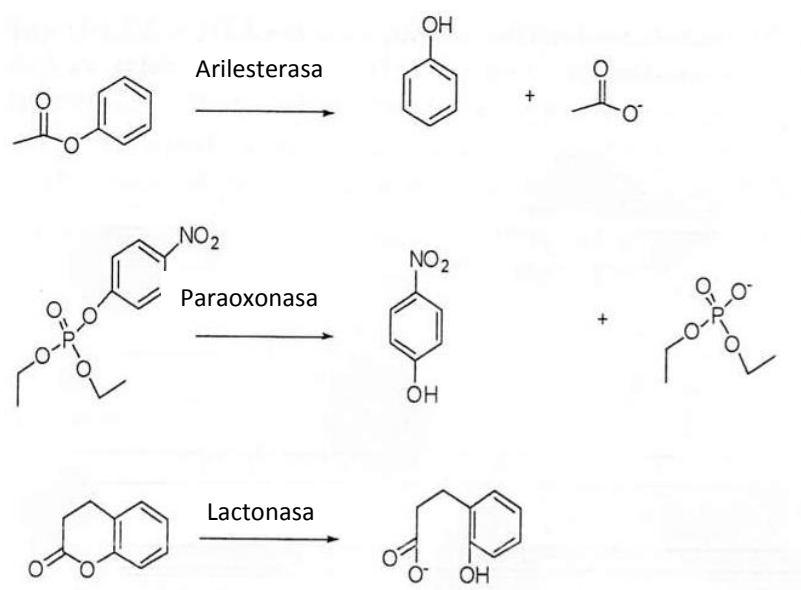
Se ha sugerido que el efecto beneficioso en la ECV de las HDL se debe a la enzima paraoxonasa 1 (PON1) que llevan unidas (Draganov y col., 2000). Es una glicoproteína  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de 44 kDa con tres actividades principales (Figura 1.12):

Arilesterasa: hidroliza ésteres aromáticos.

Paraoxonasa: Hidroliza compuestos organofosforados

Lactonasa: hidroliza lactonas alifáticas y aromáticas además de catalizar la reacción reversas de lactonización de ácidos hidroxicarboxílicos (Billecke y col., 2000).

Según Mackness B y col. (1998a), el hígado es el principal responsable de la síntesis, almacenamiento y secreción de la PON1. La primera vez que se detectó la actividad de la enzima PON1 en suero humano fue mediante electroforesis en inmunoprecipitados de HDL (Uriel, 1961). Posteriormente, gracias a la filtración en gel (FPLC, acrónimo de *fast protein liquid column chromatography*), se supo que la PON1 está íntimamente ligada a la fracción HDL en suero humano. Se ha visto que es muy difícil aislar la PON1 de las HDL y de la Apo A1, por lo que se ha sugerido que la Apo A1 es un factor que condiciona su ubicación (Blatter y col., 1993). El proceso de purificación de esta enzima es muy complejo (Harel y col., 2004a, 2004b), y no se incluyó en el Protein Data Bank hasta 2004 (PDB, 2004). Diversos autores proponen que la PON1 obtenida por inmunopurificación se localiza en una subfracción de las HDL donde a su vez se hallan la Apo A1 y la Apo J ó clusterina (de Silva y col., 1990; Kelso y col., 1994). Se ha detectado su presencia en las HDL 3 y en la fracción VLDL (de Silva y col., 1990; Kelso y col., 1994). También se encuentra en suero y en líquido intersticial (Mackness B y col., 1998b), y en órganos como hígado, riñón e intestino delgado. Sin embargo, se desconoce si esta PON1 tisular contribuye a la actividad plasmática (Mackness MI y col, 1998).



**Figura 1.12.** Reacciones catalizadas por la enzima PON1.

Aunque aún se desconocen muchos aspectos de esta enzima, numerosos grupos han atribuido las propiedades antiaterogénicas de la PON1 a:

Protección frente al estrés oxidativo de LDL, HDL y macrófagos.(Mackness y col, 1993; Aviram y col., 1998a, 1998b; Mackness MI y col., 1998; Aviram y col., 1999; Shih y col., 2000; Ylä-Herttuala y col., 2000; Rozenberg y col., 2003a, Aviram y col., 2004; Rozenberg y col., 2005).

Inhibición de la síntesis de moléculas que facilitan la adhesión de los monocitos a la pared vascular (Cockerill y col., 2001a, 2001b; Mackness y col., 2004).

Disminución de la captación de las LDL oxidadas (LDLox) por los macrófagos, impidiendo la formación de células espumosas (Fuhrman y col., 2002).

Inhibición de la síntesis de colesterol por los macrófagos (Rozenberg y col., 2003b).

La captación de colesterol celular por parte de las HDL es un proceso que necesita de la colaboración de la LCAT, que probablemente va unida a las HDL tras su síntesis hepática, para catalizar la esterificación del colesterol. De esta manera las HDL, a medida que van captando el exceso de colesterol de la membrana celular e intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG (VLDL y QM), van integrando CE en su núcleo no polar aumentando su volumen, haciéndose esféricas y disminuyendo su densidad. El CE en esta partícula madura de HDL será tomada selectivamente por el hígado mediante la interacción de HDL con el receptor de HDL (receptor SR-B1). Un 50% del CE se transfiere por la CETP del HDL a las lipoproteínas que contienen Apo B (VLDL, IDL y LDL).

#### RECEPTOR DE HDL SR-B1

El receptor de HDL SR-B1 interacciona con HDL en la superficie de tejidos esteroideogénicos como hígado, glándula adrenal y ovarios. Los CE localizados en el “core” de las HDL se captan selectivamente por estas células, liberándose al plasma las HDL empobrecidas en CE para reciclarse y poder captar más colesterol. Tras la hidrólisis del CE, el colesterol liberado se puede emplear para síntesis de hormonas esteroideas o ácidos biliares. Por otro lado, si se internalizan las partículas HDL, se transportan a los endosomas y lisosomas para su degradación (Kwiterovich, 2000).

#### HETEROGENEIDAD DE LIPOPROTEÍNAS Y RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.

Un retraso en la retirada de QM remanentes promoverá la aterogénesis. En individuos sanos los niveles de TG postprandiales vuelven a niveles basales a las 8-10 horas tras la ingesta de grasa. En cambio, los pacientes con enfermedad coronaria tienen mayor elevación y un retraso la normalización de los niveles de los TG postprandiales por la retirada de QM remanentes más lenta.

Está demostrada la relación de los niveles LDLc y HDLc con el RCV (Navab y col., 1996). La concentración en plasma de los niveles de LDLc se relaciona positivamente con el RCV, mientras que los de HDLc se relacionan negativamente (Castelli, 1984, Gordon y col., 1977). Niveles séricos elevados de LDL, VLDL, IDL y lipoproteína (a) (Lp(a)) pueden promover

aterosclerosis. Cuando estas lipoproteínas atraviesan la barrera endotelial y entran en la pared vascular, se pueden oxidar y ser fagocitadas por los macrófagos a través de receptores *scavenger* CD36 y SR-A. Posteriormente se transforman en células espumosas. Las células endoteliales activadas de los vasos sanguíneos y las células espumosas pueden secretar factores de crecimiento que estimulan la proliferación y la migración de las células musculares lisas de las paredes arteriales. Por último este proceso resulta en la formación de la placa de ateroma (Kwiterovich, 2000).

El perfil lipoproteico plasmático que acompaña un predominio de partículas LDL pequeñas y densas (específicamente LDL 3) se asocia con un incremento en 3 veces del riesgo de enfermedad coronaria. Se ha visto que las LDL más pequeñas y densas tienen mayor propensión para ser captadas por el tejido arterial que las LDL más grandes, sugiriendo un mayor transporte endotelial de las partículas pequeñas.

Se ha documentado que las subfracciones de LDL difieren en la susceptibilidad al estrés oxidativo *in vitro*. En concreto las LDL grandes son más resistentes y las pequeñas más susceptibles a la oxidación. Se han propuesto varios factores que contribuyen a esta diferencia en la oxidación, como alteración en las propiedades de la capa lipídica asociadas con disminución en el contenido de colesterol libre, disminución en el contenido de antioxidantes o aumento de AG poliinsaturados (AGP) (Berneis y Krauss, 2002).

En el estudio Quebec, tanto el nivel de partículas LDL pequeñas como el de Apo B resultaron ser predictores de riesgo de enfermedad coronaria independientes de otros factores, incluyendo los TG plasmáticos. Se encontró una fuerte interacción del tamaño de LDL pequeñas (<256 Å) con otros factores de riesgo, resultando una odds ratio (OR) de 4,9 para enfermedad coronaria combinada con colesterol total (CT)/HDLc >6 y una OR de 6,2 combinada con Apo B >120mg/dL (Lamarche y col., 1996).

La Lp(a) es otra de las lipoproteínas principales que contienen Apo B y aparece como un componente importante en el desarrollo de la enfermedad coronaria. La Apo (a), componente de la Lp(a), puede promover trombosis en la superficie de las células endoteliales interfiriendo con el paso de plasminógeno a plasmina. Otro mecanismo por el que la Lp(a) puede promover la trombosis es estimulando la síntesis del inhibidor-1 del activador del plasminógeno. Se ha encontrado que niveles elevados de Lp(a) son factor de riesgo independiente para la enfermedad coronaria en hombres y mujeres.

Hay cuatro mecanismos potenciales para explicar el efecto cardioprotector de las HDL: Transporte reverso del colesterol, inhibición de la oxidación de LDL, reducción de los niveles de proteínas de adhesión y aumento de fibrinólisis (Kwiterovich 2000).

## METABOLISMO EN EL RECIÉN NACIDO

### METABOLISMO LIPOPROTEICO

Durante el período prenatal algunos cambios en el aporte nutricional pueden causar modificaciones en la utilización de sustratos por el feto y el recién nacido, que a su vez pueden tener efectos determinantes en su fisiología.

Es necesario un flujo continuo de nutrientes y sustancias bioactivas desde la placenta al feto para asegurar su crecimiento, desarrollo y maduración. Además de la síntesis proteica también tiene lugar el almacenamiento de glucógeno y grasas. Durante los períodos del parto y puerperio, este flujo constante se interrumpe. La glucemia se mantiene a costa del glucógeno, agotando los depósitos, lo que da lugar al comienzo de una glucogénesis activa. En el período perinatal, la oxidación de los AG y cuerpos cetónicos proporcionan importantes cantidades de energía, y durante este período se hace necesaria una adaptación a dietas lácteas ricas en grasa. Estas adaptaciones se controlan mediante cambios en el flujo de sustratos y en el medio hormonal del feto y del recién nacido, que originan rápidas modificaciones en la síntesis y metabolismo de las lipoproteínas, cuya composición cambia después del nacimiento.

No debe olvidarse la interacción que los nutrientes y sustancias bioactivas ejercen sobre nuestro genoma modulando multitud de factores de transcripción, que a su vez ponen en marcha la formación de sustratos, hormonas y enzimas para asegurar la mejor utilización de tales nutrientes, conocido como nutrigenómica, así como las influencias nutricionales sobre el patrón epigenético. Por ejemplo, una alimentación con una dieta deficiente en donadores de grupos metilo conduce a una hipometilación progresiva del ADN. Esto lleva a la formación de una heterocromatina más relajada, probablemente con una mayor actividad de transcripción génica. Por el contrario una dieta rica en metionina, folato y colina conduce a la metilación de las histonas y del ADN en las regiones promotoras (Gil Hernandez y col., 2010).

Los lípidos tienen gran importancia en el desarrollo embrionario y fetal. La cantidad de lípidos del feto en desarrollo aumenta alrededor de 300 veces desde el inicio hasta el final del embarazo (Watanabe, 1967; Roux y Yoshioka, 1970), y la lipogénesis a partir de hidratos de carbono es significativamente más elevada en el feto que en el adulto. Se ha calculado que la cantidad de grasa que se deposita en el feto es alrededor de 28-35 mg/día al inicio de la gestación, mientras que en el periodo a término es de unos 5 g/día. Por otra parte, el porcentaje de lípidos del feto humano a término oscila entre un 9 y un 16%.

Se ha señalado que hay una correlación entre el incremento de peso y del contenido lipídico en los diferentes órganos fetales durante la etapa de desarrollo (Roux y col., 1971). A partir de la semana 34 de gestación es cuando se produce el aumento más significativo del depósito de lípidos en el tejido adiposo. Esta reserva grasa tiene un importante papel en el recién nacido, pues le permitirá hacer frente a las necesidades energéticas de los primeros días de vida extrauterina, cuando empieza a recibir una alimentación discontinua basada en una dieta rica en lípidos, en contraste con la dieta parenteral intrauterina, compuesta casi exclusivamente de hidratos de carbono, que el feto recibe de forma continua.

En los niños prematuros y en los fetos con retraso del crecimiento, el depósito del tejido adiposo suele ser insuficiente para poder ampliar las demandas energéticas de la vida extrauterina con respecto a los recién nacidos normopeso. Por esto, es necesario suplementar su alimentación con una dieta rica en energía a base de aminoácidos, glucosa y una emulsión de lípidos. Estos últimos no siempre se toleran bien, y depende de la presencia, o de la inducción de los sistemas enzimáticos del metabolismo lipídico.

Una vez descrita la importancia de los lípidos en el neonato, haremos una breve exposición de la biosíntesis de algunos de ellos.

#### COLESTEROL

Es ampliamente conocido que el colesterol es un componente esencial de la membrana plasmática en células animales. Su presencia le confiere una determinada fluidez y determina su permeabilidad, pero también afecta a la actividad de diversas proteínas de membrana. La síntesis de colesterol está estrechamente relacionada con la proliferación celular, como mostraron por primera vez Chen y col. en 1975 (citado por Lasunción y col., 2000). Las células proliferantes presentan una alta tasa de síntesis de colesterol, con actividades incrementadas de hidroximetil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y del LDL-R, asegurando la disponibilidad del colesterol necesario para la formación de membranas.

El colesterol fetal puede tener diversas procedencias:

a) Transferencia placentaria materna: Los niveles de CT en el plasma fetal son siempre inferiores a los del plasma materno. No obstante, no existe relación entre las cifras de CT plasmático de la madre y las del cordón al nacimiento (Ramón y Cajal y col., 1985). Se han comunicado resultados diferentes sobre el paso de colesterol a través de la placenta, lo que podría explicarse por las variaciones de la función placentaria dependientes de la gestación. Así, Tsang y Glueck (1975) no observaron apenas transferencia de colesterol de la madre al feto, contrastando con otros estudios en los que se encontró que el 20% de colesterol fetal provenía de la madre (Lin y col., 1977).

b) Contribución placentaria: La biosíntesis de colesterol en la placenta es limitadísima, a pesar de que este órgano posee todas las enzimas necesarias para ello. Además se ha visto que se inhibe en presencia de LDL (Khamisi y col., 1972).

c) Síntesis fetal de colesterol: El colesterol fetal proviene mayoritariamente de la síntesis fetal endógena. Los principales órganos de síntesis del colesterol fetal son el hígado y las glándulas suprarrenales, pero en el feto a término éstas últimas utilizan el colesterol de las LDL para la síntesis de las hormonas esteroideas (Carr y col., 1980; Carr y Simpson, 1981). Otros tejidos, como la mucosa intestinal y el tejido adiposo marrón, realizan colesterogénesis en menor proporción (Noble y Shand, 1983; Kröeger y Hahn, 1983). El hígado fetal sintetiza colesterol a partir de cuerpos cetónicos, glucosa, acetato y piruvato gracias a la elevada actividad de la enzima  $\beta$ -HMG-CoA reductasa que presenta. Kröeger y Hahn (1983) indican que el feto biosintetiza colesterol a una velocidad igual o incluso mayor que el adulto. Este proceso se activa entre otros factores, por la progesterona, estrógenos y glucocorticoides (Hahn, 1982; Carr y Simpson, 1984). El cerebro también sintetiza colesterol, destinado en su mayoría a la mielinización. Se ha descrito actividad enzimática relacionada con la colesterogénesis en

cerebro fetal (HMG-CoA reductasa, pirofosfomevalonato descarboxilasa). En las primeras etapas de la vida fetal la síntesis cerebral de colesterol supera a la hepática, situación que se revierte en el periodo posnatal (García-Peregrín, 1988).

Es sabido que la colesterogénesis tiene vital importancia durante las primeras etapas de desarrollo, superando la tasa de adquisición de colesterol a la de excreción. Así, el colesterol es utilizado como componente estructural de las membranas celulares y en particular durante el proceso de mielinización, constituyendo dicho esteroide las 4/9 partes de la mielina y alrededor del 20% de los lípidos cerebrales. En humanos la mielinización comienza hacia el cuarto mes de gestación, completándose después del nacimiento hasta el segundo año de vida (García-Peregrín, 1988). El colesterol acumulado a nivel cerebral en su mayoría es libre, mientras que a nivel hepático aparece como CE.

Según un estudio efectuado en sangre de cordón de abortos, prematuros y recién nacidos a término, los niveles de CT varían a lo largo de la gestación (Johnson y col., 1982). Teniendo en cuenta el papel central del colesterol en la síntesis de hormonas y, en particular, de las hormonas adrenales (Pocoví, 1988), una explicación a los cambios de concentración en el CT plasmático fetal a lo largo de la gestación sería: en la primera mitad del embarazo, la elevada concentración de CT se debe a una gran velocidad de biosíntesis hepática y de la glándula adrenal (Givner y Jaffe, 1971). Entre las semanas 16 y 28 de gestación, paralelamente a la disminución de los niveles de CT, se produce un incremento del tamaño de las glándulas adrenales. Entre las semanas 28 y 32 el tamaño de las glándulas adrenales prácticamente no se modifica, pero se observa un nuevo aumento de la concentración plasmática fetal de CT. Poco antes de que el feto alcance su madurez, se produce el segundo descenso de CT (Johnson y col., 1982; Parker y col., 1983a). Esta teoría, que relaciona el nivel de CT con la producción de hormonas esteroideas, está respaldada por el hecho de que en los neonatos anencefálicos, que tienen las adrenales atrofiadas, el CT está elevado y segregan poca cantidad de esteroides en relación con los fetos normales (Parker y col., 1983b). De esto se puede concluir que la velocidad de esteroidogénesis de la glándula adrenal fetal humana parece ser un determinante importante de los niveles de CT plasmático del feto y del recién nacido.

Otras teorías proponen que las modificaciones en la concentración de CT se deben a variaciones en las velocidades relativas de síntesis y utilización del colesterol plasmático por parte del feto. La concentración plasmática de CT disminuye progresivamente desde la semana 31-32 hasta la 41-42 de gestación, lo que parece relacionarse sólo con una disminución de los niveles de LDLc, ya que las concentraciones de HDLc se mantienen bastante estables durante el último tercio del embarazo (Parker y col., 1983a). Por otro lado, Bastida y col. (1997) señalan una estabilidad muy marcada de los niveles de LDLc durante las semanas 38-42 del período a término.

Parece demostrado que la disponibilidad de LDLc circulante en el feto juega un papel fundamental en el mantenimiento del embarazo, ya que sirve de sustrato para la esteroidogénesis, lo que resulta de importancia vital para el crecimiento y desarrollo fetal.

Desde hace tiempo se conocen los aspectos generales de la regulación de la colesterogénesis (García-Peregrín, 1988). Uno de los centros de atención más importantes lo



constituye el paso metabólico de HMG-CoA a mevalonato, regulado por la HMG-CoA reductasa. Además de esta enzima limitante de la síntesis de colesterol, se han descrito al menos tres puntos secundarios de regulación de la colesterogénesis posteriores a la síntesis de mevalonato. Parece interesante la ruta por la que se produce HMG-CoA a partir del mevalonato, lo que descartaría la irreversibilidad plena del paso HMG-CoA a mevalonato. A esta vía se le ha denominado "derivación de mevalonato", "ruta de los no esteroides" o "ruta cetogénica".

A diferencia de lo que ocurre en adultos, se ha descrito la existencia de LPL en el hígado fetal a término, lo que le permite captar la mayor parte de la grasa para la síntesis de cuerpos cetónicos, que utilizará en el periodo perinatal como combustibles básicos.

#### COLESTEROL PLASMÁTICO EN RECIÉN NACIDOS

El estudio de las concentraciones plasmáticas de CT en el recién nacido ha suscitado un gran interés, sobre todo por la utilidad que puede tener como variable predictiva de RCV en la edad adulta. Por ello se han intentado correlacionar tanto estos niveles, como los de LDL y sobre todo los del HDLc, con el desarrollo ulterior en la vida adulta de hipercolesterolemia y la consecuencia más grave de la misma, la aterosclerosis.

En adultos, diferentes factores socioeconómicos, culturales y dietéticos ejercen un efecto notable sobre la concentración plasmática de CT (Alberti-Fidanza y col., 1995; Cuesta y col., 1989). Sin embargo, en los neonatos, las cifras medias de CT son semejantes en poblaciones de distintas áreas geográficas, étnicas socioeconómicas o con diferente alimentación materna (Tabla 1.3).

Está unánimemente aceptado que los niveles de CT en sangre de cordón y en el neonato son inferiores a los del adulto, y que tras el nacimiento, estos niveles se elevan rápidamente ya en las primeras horas de vida, ascenso que sigue siendo muy importante en días sucesivos, en especial hasta el primer mes de vida (Christensen, 1981; Kirstein y col., 1985; Lane y McConathy, 1986). Algunos autores (Lastra Sánchez y Martínez Valverde, 1988) han podido constatar que existen unos niveles significativamente más altos de CT en niñas de bajo peso al nacer que en varones, lo que coincide con los resultados obtenidos por McConathy y Lane (1980) y Sánchez-Muniz y col. (1994) en sangre de cordón de recién nacidos normopeso.

Una última consideración es la que se refiere a la asociación entre niveles de CT en cordón umbilical con hipercolesterolemia infantil. Es un tema controvertido, aunque existen multitud de estudios que sugieren una asociación familiar posiblemente de índole genética, sin olvidar los factores ambientales. Bastida y col. (2007) encontraron en la población Área de Toledo que los lípidos de los niños a los 4 años podían predecirse conociendo su CT al nacimiento y los lípidos de sus progenitores.

#### TRIGLICÉRIDOS

Los niveles de TG son interesantes, ya que también están considerados como factores de riesgo para la enfermedad coronaria, por lo que parece oportuno su control y seguimiento desde edades tempranas.

No hay datos que indiquen un transporte de los TG intactos desde la circulación materna a la fetal. Así, los TG de las lipoproteínas plasmáticas maternas son hidrolizados por las LPL placentarias, formándose AG y glicerol, que sí pueden atravesar la placenta (Mallov y Alousi, 1965), y llegar al hígado fetal para originar TG (Szabo y col., 1973).

La importancia de almacenar grasa en el tejido adiposo fetal es crear una reserva de energía para poder afrontar las demandas metabólicas del período perinatal. Un déficit de hidratos de carbono de la dieta induce una hidrólisis de los TG del tejido adiposo, liberándose AGL y glicerol. Los AG son la principal fuente de energía para el tejido muscular, ahorrando glucosa para los tejidos muy dependientes de ella como el cerebro.

En los neonatos, la actividad LPL es muy baja, especialmente en el tejido adiposo, lo que permite que la mayoría de los TG se consuman en lugar de almacenarse. En neonatos prematuros o con RCIU es casi indetectable, lo que significa que la alimentación con TG no sería útil en estos casos a pesar de ser la más energética en condiciones normales.

Se ha observado que la cantidad de grasa en el neonato a término es de un 15-16% del peso total. Los recién nacidos pretérmino con peso de 2,5 kg acumulan aproximadamente el 6% de su peso como grasa, siendo esta proporción alrededor de un 3,5% en los que pesan 1,5 kg. En el caso de los neonatos con un peso superior a los 4,0 kg, la grasa corporal se sitúa en torno al 28% (Pocoví, 1988).

Estas reservas grasas se encuentran tanto en el tejido adiposo marrón como en el blanco. Los TG acumulados en el primero se utilizan *in situ*, y su significado fisiológico es la producción de calor en casos de cambios bruscos de temperatura. La liberación de AG del tejido adiposo marrón por el efecto del frío supone un mecanismo complejo, que implica a una serie de enzimas del metabolismo lipídico, receptores de noradrenalina y el propio hipotálamo del feto, que debe ser funcional en el momento de nacer. Una deficiencia en la reserva de grasa contribuye al incremento de la mortalidad perinatal en los recién nacidos pretérmino. Respecto al tejido adiposo blanco hay que señalar que, a diferencia de los adipocitos del tejido adiposo marrón, los adipocitos blancos poseen una sola gota de grasa que desplaza el núcleo hacia la periferia, encontrándose también mitocondrias y otras organelas que posibilitan tanto la lipogénesis como la lipólisis. En el período perinatal, el aporte de sustratos está reducido, y el neonato se encuentra sometido al estrés del proceso del parto y del cambio de temperatura, que implica el paso de un medio a temperatura constante de 37°C a otro más frío. Esto implica que se active la lipólisis a través de la lipasa sensible a hormonas, liberándose AG del tejido adiposo que se dirigen al hígado, músculo y otras células corporales para la obtención de energía o la síntesis de lípidos (TG, CE, PL). La lipasa sensible a hormonas se activa por las hormonas del estrés (hormona adrenocorticotropa (ACTH)), adrenalina, noradrenalina, corticoides), así como por la hormona del crecimiento (GH). El acoplamiento entre el metabolismo lipídico e hidrocarbonado que asegura una buena obtención de energía se da en el ciclo glucosa/AG, aspecto que se comentará más adelante.

Los niveles de TG siguen una secuencia paralela a los del CT, aunque sus variaciones son mayores, aumentando progresivamente a lo largo de la gestación (Roux y col., 1971) e incluso durante el período a término (Bastida y col., 1997). Bastida y col. (2007), describen una

relación directamente proporcional entre la concentración de TG y la edad gestacional. Al final de la gestación los niveles circulantes de TG son muy bajos en el feto y a diferencia del adulto son transportados principalmente por las LDL y, en menor proporción por las HDL y VLDL (Llobera y Ramírez, 1988). Dado que tanto el depósito de TG como el rápido incremento de peso continúan después de las 40 semanas de gestación (Reichman y col., 1981), la actividad del metabolismo lipídico debe incrementarse significativamente. Un aumento de TG por encima de los valores normales está asociado con distrés fetal (Hardell, 1981b; Perea, 1994; Videira Amaral y col., 1986) como consecuencia de una falta de captación de AG para la síntesis de surfactante pulmonar, o bien con el aumento de peso corporal del neonato (Lane y McConathy, 1983). Molina y col. (2000) estudiando neonatos con RCIU, no encontraron diferencias significativas respecto a los controles en muchos parámetros lipídicos y apolipoproteicos (CT, HDLc, LDLc, Apo A1, Apo B), pero en el caso de los TG sí observaron que tanto los niños como las niñas con RCIU tenían valores significativamente mayores que los controles.

#### LIPOPROTEÍNAS

En recién nacidos los perfiles lipídico y lipoproteico son significativamente diferentes de los observados en adultos, tanto en concentración como en distribución, salvo en algunos neonatos procedentes de madres hipertensas, diabéticas o con otras enfermedades asociadas con alteraciones fetales (Pocoví, 1988). Los fetos humanos se caracterizan por tener niveles bajos de lípidos séricos, independientemente de que la madre presente hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia (Bansal y col., 2005). Esta baja concentración de lipoproteínas, se debe, entre otros aspectos, al pequeño aporte de lípidos exógenos (Sánchez Pozo y Gil Hrenández, 2010) y a los condicionantes metabólicos específicos de la fase final de la gestación. En recién nacidos se han descrito todos los tipos de lipoproteínas, siendo mayoritarias las HDL, mientras que las VLDL y LDL están presentes en menor concentración (McConathy y Lane, 1980; Van Biervliet y col., 1980, 1981, 1982; Davis y Forte, 1982; Lane y McConathy, 1983; Bastida y col., 1997; Sánchez-Muniz y col., 1997).

Existe gran interés por tratar de relacionar el patrón plasmático de lipoproteínas en la etapa perinatal con el riesgo precoz de aterosclerosis (Deyose y col., 1987).

Un elevado porcentaje de las lipoproteínas fetales son sintetizadas en el hígado fetal a partir de los AG y del colesterol, cuyas rutas metabólicas se describieron anteriormente. Ante la ausencia de carnitina, que impide la oxidación de los AG procedentes de las lipoproteínas de la madre, aquellos que alcanzan el hígado, pasan a formar parte de las lipoproteínas. Estos AG se usan con fines biosintéticos, como por ejemplo, para la síntesis de surfactante.

En la fase final del embarazo y al nacimiento se detectan fundamentalmente LDL y HDL, y en menor proporción VLDL y Lp(a). Durante el periodo fetal, la sangre carece de QM (Tabla 1.3). Las LDL participan en el transporte de colesterol hacia células proliferativas, siendo activamente captadas por los LDL-R (Cai y col., 1991), mientras que las HDL se forman mediante un mecanismo que controla el nivel de colesterol en gran parte de las células del cuerpo utilizando el transportador ABC (Rodríguez Sinovas, 2011). La funcionalidad de la Lp(a) permanece sin definir completamente, aunque parece ejercer un papel activo en la renovación

de tejidos. Su concentración es muy baja en el recién nacido (Tabla 1.3) y aumenta a los pocos días del nacimiento.

En sangre de cordón, las LDL séricas son más ricas en TG que las del adulto, y la fracción HDL está predominantemente formada por partículas de muy pequeño tamaño enriquecidas en Apo E (Nagasaka y col., 2002; Fujita y col., 2008). Esto se corresponde con la misión de las HDL en la provisión de colesterol hacia los tejidos en crecimiento, y muy probablemente también con el transporte reverso del colesterol y su reutilización para formar de nuevo VLDL y LDL. En la sangre de cordón de neonatos a término, la edad gestacional parece influir sobre la concentración y composición de las LDL (Sánchez Muniz y col., 1997). Un estudio de Bastida y col. (1998) demostró que el género y los niveles de CT influyen también sobre la composición de las HDL neonatales.

Algunos investigadores describen la formación de VLDL en yeyuno cuando solamente le son asequibles lípidos endógenos. No obstante, a pesar de que el feto tiene capacidad para sintetizar VLDL (Carlson y Hardell, 1978) los niveles circulantes de estas lipoproteínas son muy reducidos (Tabla 1.3), aproximadamente un 25-50% de las concentraciones que se encuentran en adultos (Ramírez y col., 1983; Aversa y col., 1991; Yonezawa y col., 2009) y contienen menos TG y más CE. Estas diferencias pueden deberse a que la capacidad de biosíntesis de los lípidos fetales es todavía baja, o bien, a una mayor utilización de estas VLDL por los tejidos periféricos. El incremento metabólico de las VLDL, tendería a incrementar la cantidad de LDL (Ramírez y col., 1983; Argiles y Herrera, 1981), a pesar de que éstas son masivamente utilizadas por los tejidos esteroideogénicos.

La concentración de lipoproteínas aumenta durante el periodo fetal hasta el momento del nacimiento, en que disminuyen. Esta disminución se debe sobre todo al descenso de la lipogénesis hepática. Como ya se ha comentado, en sangre de cordón, las concentraciones de CT, TG, VLDL, LDL y HDL son más bajas que en el adulto. Así, las de CT y LDLc son aproximadamente la tercera parte, mientras que los de HDLc y TG son prácticamente la mitad (Roux y col., 1971; Aversa y col., 1991; Nagasaka y col., 2002) (Tabla 1.3).

La síntesis de HDL tiene lugar preferentemente en hígado, intestino y placenta. Además, se ha sugerido que puede existir una transferencia placentaria de HDL intactas. Por otra parte las velocidades de esterificación de colesterol entre las distintas fracciones lipoproteicas deben ser lentas, habida cuenta de la baja actividad de LCAT encontrada en la etapa fetal (Dobiasova y col., 1984). Tras el nacimiento, la actividad de LCAT aumenta rápidamente. Su expresión no aumenta en prematuros alimentados parenteralmente, lo que sugiere que es necesario el desarrollo intestinal para normalizar la actividad enzimática. Uno de los activadores de la LCAT es la Apo A4, que se sintetiza exclusivamente en intestino.

Otros estudios realizados en sangre de cordón (Davis y Forte, 1982 y Davis y col., 1983a, 1983b) mencionan la existencia de subfracciones de lipoproteínas, como las HDL 2 y HDL 3. La subclase HDL 3c, la más pequeña de las HDL, es la única fracción lipoproteica con mayor concentración en sangre de cordón que en adultos. De hecho, es la más abundante en neonatos y la más escasa en adultos. Este predominio de la HDL 3 podría estar relacionado con la baja actividad del transporte reverso de colesterol, ya que éste es eliminado de la circulación

por el hígado unido a las HDL menos densas y de mayor tamaño. La concentración de CT en suero correlaciona directamente con los niveles de HDL 2b y HDL 2a, situación limitada al contenido en colesterol de las HDL en ambos sexos. Según Kherkeulidze y col. (1991), los TG en suero están inversamente relacionados, sólo en recién nacidos, con los niveles de HDL 2. Los neonatos con altos niveles de HDL 2 también presentan bajos niveles de colesterol transportado por VLDL (VLDLc), y altos de HDLc.

Fønnebo y col. (1991) realizaron un seguimiento de neonatos con altos y bajos niveles de VLDLc y LDLc en el momento del nacimiento, repitiendo las determinaciones a los 2 y a los 13 años de vida. Encontraron que seguían manteniéndose las diferencias entre ambos grupos, por lo que consideraron que los valores de estos parámetros en el momento del nacimiento podían ser predictivos de los que se alcancen en las edades estudiadas. Resultados parecidos obtuvieron Van Stiphout (1986) y Akerblom y col. (1989). También nuestro grupo de investigación ha encontrado relaciones entre marcadores de RCV al nacimiento, a los 4 años (Bastida y col., 2007) y en la adolescencia (Martínez-Sesmero, 2012). Los niños que al nacimiento presentaban dislipemia o hipercolesterolemia, también tenían modificado el perfil lipídico a los 4 años, encontrándose además concurrencia con los niveles de tensión arterial. La relación de la dieta con estos resultados no está del todo clara y sólo se podrá establecer con la realización de nuevas investigaciones posteriores.

En resumen, se puede decir que en los neonatos los niveles de todas las fracciones lipoproteicas son inferiores a los de los adultos. Los QM no existen en la vida fetal. El patrón lipoproteico es diferente al del adulto, ya que hay una preponderancia de HDL y una proporción baja de LDL y muy baja de VLDL, lo que lleva a una elevada relación LDL/VLDL. Por otra parte, su composición también es distinta a la del adulto, ya que los TG circulantes son transportados principalmente por las LDL y, en menor proporción, por las HDL y VLDL.

Además hay que tener en cuenta que existe un bajo cociente LDL/HDL, atribuido principalmente a una reducida actividad de esterificación del colesterol en las HDL y transferencia desde éstas hacia otras lipoproteínas como VLDL e IDL en formación, y al descenso de LDL en la fase a término, relacionado con la esteroidogénesis. Sin embargo, no parece que haya un incremento de la actividad del LDL-R en las fases finales de la gestación (Andersen y Johansen, 1980).

También se ha investigado sobre la composición apolipoproteica de todas las fracciones en el neonato, estudiándose las posibles relaciones de las mismas con las de la madre (Lane y McConathy, 1983). Se han encontrado correlaciones positivas significativas entre los niveles de Apo D y TG, o negativas entre Apo E y edad gestacional. Ésta, a su vez, está relacionada con la disminución de los niveles de CT (Averna y col., 1991; Carlson y Hardell, 1978). Al nacimiento, la concentración de Apos es más baja que en el adulto (Tabla 1.3), especialmente para Apo B (Averna y col., 1991; Bastida y col., 1996a) y Apo C3 (Van Biervliet y col., 1980; Averna y col., 1991). La concentración de Apo E al nacimiento es comparable a la de adultos (Van Biervliet y col., 1980), pero su distribución entre las lipoproteínas es significativamente diferente, ya que más del 80% de la Apo E plasmática se encuentra en las HDL. Este perfil del neonato sufre una rápida evolución hacia un perfil de adultos durante el primer mes de vida, afectando en diferente modo a varios lípidos y Apos. Bastida y col., (1996b) establecieron los niveles medios

de Apo A1 y Apo B y su modificación a lo largo del período a término en una población de referencia de neonatos españoles.

Van Biervliet y col. (1980) señalan que entre los días 7 y 30, la concentración de Apo E es similar a la del nacimiento, pero ha tenido lugar una redistribución desde las HDL a las VLDL. La Apo C3, de forma similar a la Apo B, se incrementa del orden de dos veces desde el día 0 al 7. Los TG plasmáticos se elevan durante la primera semana de vida, pudiendo ser detectadas al nacer partículas HDL enriquecidas en Apo E y Apo A2. Para compensar los bajos niveles de LDL, estas HDL ricas en Apo E deben funcionar como una fuente adicional para liberar colesterol en los tejidos periféricos mediante la vía del receptor Apo B/E. Posteriormente, la síntesis de LDL se incrementa y la Apo E es transferida a las VLDL, siendo el transporte de colesterol por la vía HDL rica en Apo E menos importante.

La concentración plasmática de Apo B resulta clave para el reconocimiento del RCV. En los niños, las concentraciones de HDLc son mayores y las de LDLc son menores que en los adultos (Srinivasan y Berenson, 1995). Por este motivo los niveles de LDLc pierden eficacia como factor discriminante de RCV en niños de corta edad. Así, en población infantil, la medida de Apo B es más predictiva de RCV que la de LDLc. Tanto el *Bogalusa Heart Study* (Newman y col., 1986), como el *European Atherosclerosis Research Study* (EARS), han demostrado que la Apo B constituye un buen marcador para identificar precozmente a sujetos en riesgo (Dennison y col., 1990). Sánchez-Muniz y col. (1997) han encontrado en neonatos con CT elevado en sangre de cordón, incrementos tanto de los niveles de Apo B como de colesterol en la fracción LDL. El cociente LDLc/Apo B señaló sólo en las niñas que tales lipoproteínas estaban enriquecidas en colesterol y por tanto eran de mayor tamaño que las LDL de las niñas normocolesterolémicas. En los neonatos varones, el incremento de colesterol y Apo B fue similar, sugiriéndose, dado el alto porcentaje de estos niños que además presentaban niveles de TG elevados, que el incremento de la fracción LDL se debió fundamentalmente al incremento de las LDL de pequeño tamaño, potencialmente más aterogénicas.

La Apo A1 es el principal componente proteico de las HDL, y en neonatos no se encuentra en ninguna otra lipoproteína. En neonatos, antes de instaurar la nutrición enteral, el aporte de colesterol libre para la esterificación por la LCAT y su posterior incorporación a HDL debe ser muy reducido, de modo que el transporte reverso del colesterol estaría disminuido y la elevada concentración de HDL de pequeño tamaño (HDL 3) reflejaría un transporte potencial no utilizado. De todas formas, un aumento en la concentración de HDL 2 se ha relacionado con niveles elevados de CT en neonatos (Kherkeulidze y col., 1991). El cociente HDLc/Apo A1 da una idea aproximada del transporte de ambos componentes en la fracción HDL, así como de las características estructurales de estas partículas. Los recién nacidos con niveles elevados de colesterol, tendrían partículas HDL más grandes, según el índice HDLc/Apo A1. Estas partículas de mayor tamaño presentan una tasa catabólica menor y son más ricas en colesterol que en Apo A1 (Bastida y col., 1997).

Los componentes apolipoproteicos de las VLDL y LDL aumentan principalmente en la primera semana de vida, mientras que en las HDL, tales incrementos ocurren después del primer mes (Van Biervliet y col., 1980, 1981). Estas variaciones también tienen lugar en las diferentes subclases de HDL (Pocoví, 1988).

## CONDICIONES PERINATALES Y NIVELES DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS DE SANGRE DE CORDÓN

Estudios previos (Cress y col., 1977; Hardell, 1981a, 1981b; Perea, 1994) han mostrado una relación entre las condiciones perinatales y los niveles de lípidos en sangre de cordón. Ciertos factores durante el embarazo y parto, así como algunas enfermedades, pueden influir en el metabolismo lipídico, pudiendo presentarse en el momento del parto hiperlipemia primaria o secundaria, hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia. Así, se ha señalado una conexión entre la hiperlipemia combinada (hipercolesterolemia + hipertrigliceridemia) y el distrés fetal (Cress y col., 1977), entre hipercolesterolemia y parto complicado (Ose y col., 1975; Díaz y col., 1989), y entre hipertrigliceridemia y problemas materno-fetales como HTA materna, trabajo de parto prolongado, líquido amniótico teñido con meconio, bajo índice de Apgar y cordón alrededor del cuello (Andersen y Friis-Hansen, 1976a, 1976b; Cress y col., 1977; Potter, 1977; Tsang y col., 1974).

Lane y McConathy (1983) señalaron que factores que normalmente modifican el metabolismo lipídico pueden tener el mismo efecto *in utero* y expresarse con cambios en los lípidos y lipoproteínas. Perea (1994) observó que la clasificación de los neonatos del Estudio Área de Toledo atendiendo a su edad gestacional en SGA, AGA y LGA, mostraba más diferencias significativas entre los lípidos y lipoproteínas de estos neonatos que la clasificación realizada sólo según el peso corporal o la edad gestacional. Lane y McConathy (1983) no encontraron diferencias para TG, CT, Apo A1 y Apo B entre los niños LGA y los AGA.

Lane y col. (2002) observaron en niños pretérmino y de bajo peso con distrés fetal, que cuando el peso al nacer estaba entre 2,0 y 2,5 kg, los niveles de lípidos (CT y TG) y Apo A1 en sangre de cordón eran superiores a los de los controles (sin distrés). En cambio, en los niños con peso al nacer entre 1,0 y 1,9 kg, las concentraciones en sangre de cordón de lípidos y Apo B eran inferiores a las de los controles.

Parker y col. (1988) señalaron que los niveles de Apo A1 se ven afectados por la edad gestacional. Blades y col. (1987) encontraron que los niveles de Apo B permanecen constantes antes de la semana 37 de gestación, incrementándose posteriormente de forma progresiva. Bastida y col. (1996a) describen incrementos significativos de los niveles de Apo B durante el período a término, tanto en niños como en niñas, mientras que las concentraciones de Apo A1 sólo aumentaron en los varones y entre las semanas 37 y 38.

Los niveles de CT también se han relacionado con la edad gestacional y con el peso al nacer (Andersen y Friis-Hansen, 1977; Fosbrooke y Wharton, 1973, Ose y col., 1975). El incremento de CT en sangre de cordón es más marcado en niños prematuros (<2,5 kg de peso y <37 semanas de gestación) (Díaz y col., 1989; Perea, 1994). También la gemelaridad (Ramón y Cajal y col., 1988) y la hiperbilirrubinemia (ambas asociadas con prematuridad) están relacionadas con los niveles aumentados de CT.

Fabiani y col. Francés (1984) no encontraron diferencias significativas en el perfil lipídico al tomar como variable el test de Apgar. En cambio, Videira Amaral y col. (1986) encontraron niveles más elevados de HDLc en neonatos con índices de Apgar <7 en el primer minuto. Según Perea (1994), se encontraron mayores diferencias en los niveles de lípidos y lipoproteínas en neonatos, clasificados según el índice de Apgar en el primer minuto (punto de corte 7), que



clasificándolos según el índice de Apgar a los 5 minutos (punto de corte 9). Perea (1994) también señaló una correlación inversa y significativa entre los niveles de Apo B y el índice de Apgar a los 5 minutos.

Según Hardell (1981b) la distribución de TG se desplazó hacia la izquierda en los niños nacidos por cesárea, mientras que los niveles de HDLc fueron más elevados en los niños con presentación de nalgas. Entre los neonatos de su estudio, Perea (1994) encontró los niveles más bajos de TG en varones nacidos por cesárea, mientras que los recién nacidos con presentación de nalgas tendían a tener niveles de CT, HDLc y Apo B más elevados.

Se han encontrado correlaciones positivas entre la disminución de los niveles de TG en sangre de cordón y diferentes alteraciones perinatales como inmadurez gestacional, diabetes materna, hiperbilirrubinemia e hipoglucemia, entre otros (Lane y McConathy, 1983).

Según Perea (1994), factores antropométricos maternos como peso, talla, índice de masa corporal (IMC), o presión arterial tienen poco efecto sobre los lípidos y lipoproteínas del feto. No obstante, encontró que a medida que se incrementaba el consumo de cigarrillos en las madres, el nivel de lípidos y lipoproteínas en sangre de cordón, particularmente de las niñas, se incrementaba. Mau y col. (1983) también han señalado el efecto del consumo de tabaco durante la gestación sobre el perfil lipoproteico neonatal.

Aunque la bibliografía que describe los cambios en las lipoproteínas a partir de la instauración de la lactancia es muy abundante (p.e. actividad enzimática, perfil lipoproteico, esterificación de colesterol, niveles de LDL, etc.) (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010), dado el ámbito de estudio de esta memoria de Tesis Doctoral, no se revisarán estos aspectos.



**Tabla 1.3.** Concentraciones de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas en sangre de cordón de algunos países

	Brasil (1)	Chile (2)	Irán (3)	Japón (4,5)	Polonia (6)	Egipto(7)	España (8)	España. (9-11)	USA (12,13)	Chile (14)	Reino Unido(15)
CT	70,4	64	76,9	65	64,4	73,5*	65,2	69,1	65,7	75	58,05*
LDLc	34,3	30	34		34,4	31,3*	30,7	31,1	33,5	-	
HDLc	26,7	27	30	36	19,5	34,8*	27,4	31,0	27,1	38,2	-
TG	-	35	67,5	23	56,5	33,8*	35,2	39,4	35,8	77,4	32,93*
ApoA1	91	74	86,1	84	89	78	62,7	73,8	81,5	-	68
Apo B	43,3	24	33,5	19	37	30	20,5	29,4	32,5	-	17,3
Lp(a)	-	1,7	20,3	4,6	-	3,7	-	-	4	-	0,5

CT: colesterol total, LDLc y HDLc: colesterol transportado por LDL y HDL, respectivamente, TG: triglicéridos, Apo: Apolipoproteína, Lp(a): lipoproteína (a).

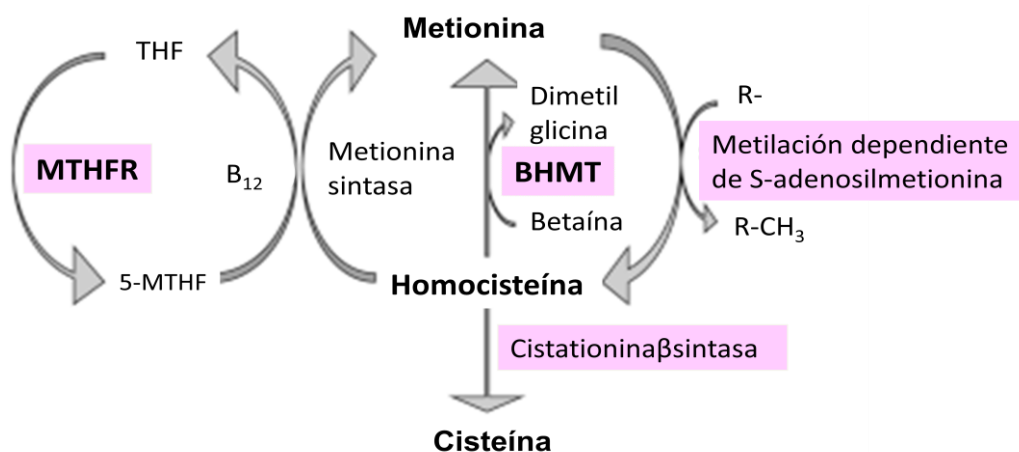
Las unidades de todos los parámetros son mg/dL. \*Valor obtenido a partir de mmol/L tras multiplicar las concentraciones de CT por 38,7 y las de TG por 89.

Los niveles de VLDL pueden calcularse según Glueck (1973) por la fórmula de Friedewald (1972), donde  $VLDLc = TG/5$

(1) Pardo y col. (2005); (2) Casanueva y col. (1998); (3) Badiie y col. (2008); (4) Shimura y col. (1997); (5) Nagasaka y col. (2002); (6) Pac-Kozuchowska (2007); (7) AbouGhalia y col. (2003); (8) Espárrago y col. (1999); (9) Sánchez-Muniz y col. (1994); (10) Bastida y col. (1996a); (11) Bastida y col. (1996b); (12) Loughrey y col. (2000); (13) Rifai y col. (1992); (14) Maliqueo y col. (2009); (15) Spencer y col. (1997)

## METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA

En la placenta humana, la ruta metabólica preferente para la homocisteína es la remetilación hacia metionina usando 5-MTHF como donador de grupos metilo, catalizado por la enzima metionina sintasa (Solanki y col., 2010). Esto implica que el metabolismo de la homocisteína en la placenta humana sea altamente dependiente de la disponibilidad de folatos, utilizados por la metionina sintasa dependiente de vitamina como sustrato para catalizar la conversión de homocisteína a metionina (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Metabolismo de la homocisteína. Adaptado de Tsitsiou y col. (2011). BHMT: betaína-homocisteína metiltransferasa, MTHF: metil tetrahidrofolato, MTHFR: metil tetrahidrofolato reductasa, THF: tetrahidrofolato.

La concentración plasmática de homocisteína (tHcys) en la madre depende del estatus de los folatos y la vitamina B<sub>12</sub>, con una relación inversa entre estos factores. Un aumento en la tHcys plasmática materna, bien por una deficiencia de estos micronutrientes, o bien por una deficiencia genética en las enzimas implicadas en este proceso, se asocia con diversas complicaciones vasculares durante el embarazo (preeclampsia, abortos, retraso del crecimiento fetal...), así como defectos en el tubo neural o malformaciones en el recién nacido. Así, los suplementos con ácido fólico y vitaminas del grupo B han demostrado su eficacia para mantener bajos los niveles de tHcys en la gestante. Estos aspectos señalan el ciclo de la metionina como clave en el desarrollo del feto, un concepto avalado por la alta mortalidad fetal encontrada en ratones carentes de metionina sintasa y por la importancia de la metilación en las modificaciones epigenéticas que ocurren en el desarrollo del embrión. Las alteraciones en esta ruta metabólica tienen consecuencias sobre el desarrollo placentario y la metilación del ADN, con gran impacto sobre la embriogénesis y el desarrollo fetal (Tsitsiou y col., 2011). De todas formas, como ya se ha comentado anteriormente, el hígado humano tiene una capacidad dihidrofolato reductasa limitada y una baja afinidad por el ácido fólico, de modo que los grandes suplementos de folatos saturarían el sistema (Couto y col., 2007; Alonso-Aperte y Varela Mosquera, 2010).

Durante el embarazo, la concentración de tHcys en plasma materno disminuye hasta alcanzar un mínimo alrededor de la semana 20. Esto ocurre independientemente de los suplementos de folato, sugiriendo que se trata de una adaptación fisiológica del embarazo. Los

niveles plasmáticos de tHcys en la madre son mayores que en el feto, y resultan ser un factor determinante para los últimos. De hecho, la concentración de tHcys en la madre previa a la concepción correlaciona significativamente con los niveles de tHcys en el feto al nacimiento (Malinow y col., 1998; Murphy y col., 2004). El paralelismo entre las concentraciones materna y fetal de tHcys se explica fácilmente considerando que la tHcys se transporta a través de la barrera placentaria. Esta hipótesis se ve respaldada por el hecho de que existe un gradiente de concentración decreciente de tHcys plasmática entre la sangre materna, la vena umbilical y la arteria umbilical. Aunque esta situación sugiera una transferencia de la tHcys por difusión pasiva, los mecanismos mediante transportadores también jugarían un papel importante, igual que en el caso de otros aminoácidos. Esta premisa se basa en la relación entre las concentraciones materna y fetal de tHcys, muy influidas por las concentraciones maternas de folatos y vitamina B<sub>12</sub> de la madre, que sugieren una ruta de transferencia materno-fetal regulada muy probablemente por una vía transcelular (Tsitsiou y col., 2011).

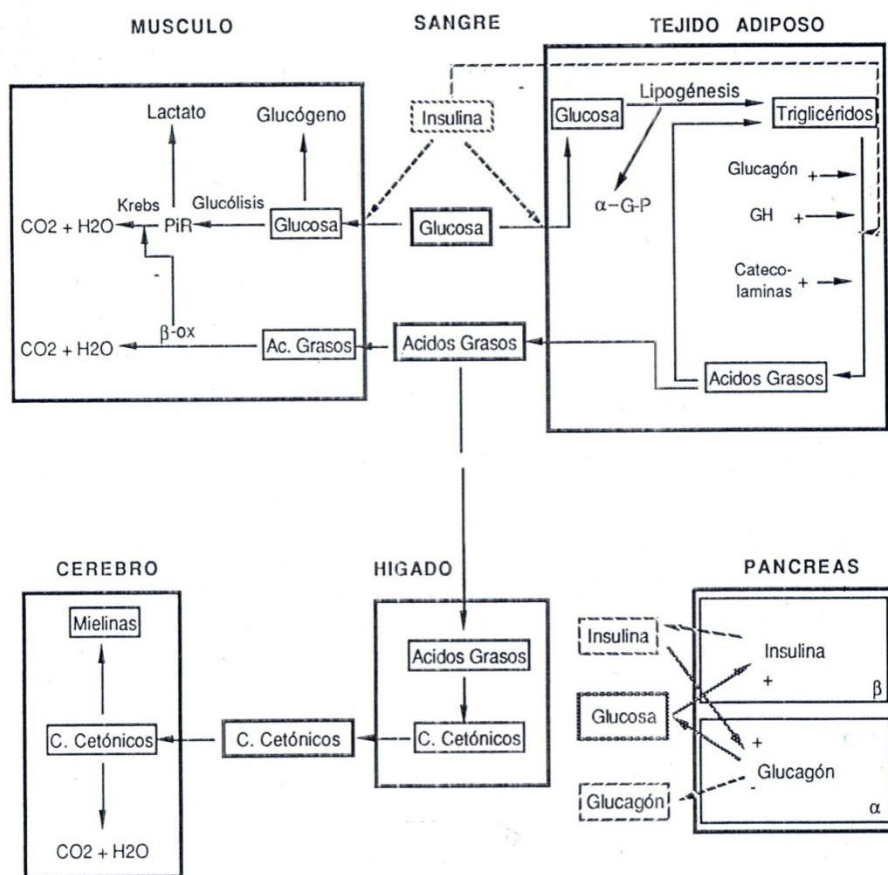
#### HOMEOSTASIS ENERGÉTICA PERINATAL. EL CICLO GLUCOSA-ÁCIDOS GRASOS.

El concepto de homeostasis energética fue propuesto por Federickson y Gordon en 1958 (citados por Medina, 1988). En él se incluye el conjunto de mecanismos que tienen los organismos más evolucionados para mantener constante el suministro de sustratos metabólicos a los diferentes tejidos, respetando las concentraciones adecuadas para las exigencias de cada uno de ellos. El ciclo glucosa/AG explica acertadamente la homeostasis energética en situaciones fisiológicas. Este ciclo se resume en la Figura 1.14, donde se relacionan los principales tejidos y las influencias inversas entre los niveles de glucosa, AG y cuerpos cetónicos.

En condiciones fisiológicas, una pequeña disminución en la glucemia disminuirá a su vez la insulinemia, desinhibiendo la secreción de glucagón pancreático. Cuando cesa la hipoglucemia, el páncreas secretará insulina en respuesta a la glucosa, e inhibirá la producción de glucagón, con la consiguiente lipogénesis en el tejido adiposo por el aumento de suministro de glicerol fosfato, e inhibición de la lipólisis. Esto lleva a una caída de los AG plasmáticos, y por tanto de los cuerpos cetónicos, quedando sólo la glucosa como fuente energética.

La ausencia de insulina disminuye la captación de glucosa por el músculo, produciendo el ahorro de la glucosa para las células que la requieren obligatoriamente (eritrocitos, retina, médula renal, gónadas, sistema nervioso, etc.). En el tejido adiposo la falta de captación de glucosa produce una caída del glicerol fosfato con inhibición de la lipogénesis y liberación de AG a la sangre al iniciarse la lipólisis. Esta lipólisis en el tejido adiposo, también se ve potenciada por la activación de la lipasa sensible a hormonas por parte del glucagón. La acción lipolítica aumenta los AG circulantes que serán utilizados por hígado y músculo. En el hígado se oxidan, aportando energía, encaminándose el acetyl Co A sobrante, resultado de la  $\beta$  oxidación, hacia la síntesis de cuerpos cetónicos que pueden ser utilizados como sustratos alternativos de los AG después de su liberación al plasma. Esto tiene una gran importancia en el neonato, sobre todo en episodios de hipoglucemia, ya que el cerebro está plenamente capacitado para utilizar cuerpos cetónicos con finalidad energética o estructural. La llegada de AG hepáticos también puede constituir una señal importante para la síntesis de VLDL. En músculo, los AG

sustituyen a la glucosa como combustible metabólico a la vez que refuerzan la inhibición de la utilización de glucosa.



**Figura 1.14** Ciclo Glucosa/Ácidos Grasos. Tomada de Medina (1988). PiR: piruvato, GH: hormona del crecimiento,  $\alpha$ -G-P:  $\alpha$  glicerol fosfato,  $\beta$ -ox:  $\beta$  oxidación.

El recién nacido dispone de importantes reservas grasas, por lo que en teoría no tendría que esperar al aporte de AG de la leche para cubrir gran parte de sus necesidades energéticas. Sin embargo, hay un retraso apreciable de la liberación de AG desde el tejido adiposo blanco (Girard y Ferré, 1982), lo que promueve la inhibición transitoria en la cetogénesis por déficit de carnitina, hasta que la leche materna suministre la carnitina necesaria para la transformación de los AG en cuerpos cetónicos.

La biodisponibilidad y sensibilidad de los tejidos a la insulina es otro de los factores de los que depende el ciclo glucosa/AG además de la insulinemia y la reserva de AG. Como ya se ha comentado anteriormente, el páncreas comienza la producción activa de insulina en la semana 20 de embarazo. En una gestación con aporte limitado de nutrientes, además de ralentizarse el crecimiento fetal, muchos órganos de su economía también se afectan negativamente. Así el páncreas fetal se ve reducido en tamaño y número de células  $\beta$ , con una menor producción de insulina. Como también se ha comentado, estos neonatos suelen presentar una mayor sensibilidad a esta hormona en sus tejidos periféricos, paliando, en parte, la limitación que

ejerce el crecimiento sobre el desarrollo y maduración de este órgano central en el metabolismo.

#### LA GLUCEMIA EN EL FETO Y EL NEONATO

Una de las características metabólicas más sobresalientes del desarrollo intrauterino es la alta capacidad glucolítica y la presencia de altas actividades de las enzimas glucolíticas en los tejidos fetales. Así la actividad hexoquinasa (HK) del hígado fetal de rata a los 18 días es 500% más elevada que en la rata adulta. Esta actividad disminuye durante los últimos días de la gestación y tras el nacimiento (Cuezva 1988). La aparición de isoenzimas diferentes a las del periodo adulto (piruvato quinasa M, HK 1y 2) supone además un cambio significativo en la regulación de la glucólisis. Meiser y col. (1982) también comprobaron la mayor actividad HK en hígado fetal de humanos. Irwin y Tan (2014) señalan en su revisión que la HK y sus reguladores constituyen actualmente un campo de investigación de gran interés. La fosforilación de la glucosa por la HK es un componente esencial de la homeostasis de la glucosa, tanto desde el punto de vista de la regulación como metabólico. También concluyen que la evolución acontecida en los mamíferos, tanto en la estructura como en la secuencia de la HK y su proteína reguladora, ha constituido un hito importante para optimizar el metabolismo de la glucosa.

La glucólisis es la forma mayoritaria de obtención de energía ya que los hepatocitos fetales muestran una baja capacidad respiratoria, debido a que el número de mitocondrias por célula hepática, la actividad del ciclo cítrico, cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa son mucho menores que en el hepatocito adulto (Hommes, 1975). Esto desemboca en una gran producción de lactato incluso por la propia placenta, y en mucha menos cuantía de acetil Co A. El flujo glucolítico hacia la producción de lactato por el feto implica un recambio metabólico para dicho sustrato muy aumentado en los últimos momentos de la gestación, que conduce a un aumento del 100% de la capacidad gluconeogénica a partir del lactato en la rata gestante (Valcarce y col., 1985).

Con ello durante la fase tardía de la gestación se produce la aparición del ciclo de Cori entre el feto y el hígado materno que viene mediado por: a) la disponibilidad de lactato, b) la hipoglucemia materna gestacional como consecuencia de la alta demanda de glucosa por el feto en crecimiento, c) la caída de la insulinemia que permita la inducción hepática de enzimas gluconeogénicas (fosfoenol piruvato carboxikinasa, (PEPCK)). Esta interdependencia metabólica entre los tejidos fetales y maternos supone una resíntesis de glucosa que supone en torno al 50% de los requerimientos del feto (Medina, 1988).

Un aspecto fundamental de la homeostasis de la glucosa es el intervalo de tiempo que transcurre entre el cese de suministro de sustratos por la circulación materna y el establecimiento efectivo de la gluconeogénesis y de la lactancia. En este periodo el neonato dependerá exclusivamente de las reservas de glucógeno muscular y hepático, así como de los TG que haya acumulado durante la etapa fetal. El glucógeno hepático suministra restos de glucosa por gracias a la glucosa-6-fosfatasa presente en el hígado neonatal, mientras que el músculo aportará el lactato que será utilizado por el ciclo de Cori o con fines energéticos o estructurales. Durante este intervalo, y dada la limitación de la glucosa circulante en el recién

nacido, se produce una hipoglucemia posnatal característica (Patel y col., 1982). La hipoglucemia durante las primeras horas de vida es más prolongada y severa en los neonatos pretérmino que en los nacidos a término (Fernández y col., 1983; Mayor y col., 1986). Constituye un factor de mortalidad perinatal asociada con disfunciones neurológicas, a la que los neonatos prematuros resultan muy vulnerables (Cuezva, 1988; Quero-Jiménez, 1988). Por ello, los neonatos pretérmino son considerados de alto riesgo. Las causas de esta hipoglucemia podrían ser a) menores reservas de glucógeno hepático, b) mayor velocidad de utilización de la glucosa circulante en las primeras horas de vida, c) menor producción de glucosa por glucogenolisis hepática y gluconeogénesis debida a una menor inducción posnatal de la PEPCK hepática (Fernández y col., 1983; Mayor y col., 1986). No obstante en la actualidad el periodo pre-lactancia tiende a acortarse al máximo.

## SÍNDROME METABÓLICO

### DEFINICIÓN

En los últimos años se ha podido constatar un aumento de la prevalencia de obesidad, DM y sus factores de riesgo asociados (Meigs, 2000; Ascaso, 2005). En 1988, Reaven propuso que la resistencia a la insulina juega un papel fundamental en la etiología de la DM2, la HTA y la enfermedad coronaria. La interrelación de estos factores, junto con otros aspectos como inflamación, alteraciones en la hemostasia y fibrinólisis (Meigs, 2000; Martínez-Sesmero y Sánchez-Muniz, 2005) conducen a la definición de lo que se conoce como SM.

El SM, conocido también como síndrome plurimetabólico, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X, es una entidad clínica controvertida que aparece con amplias variaciones fenotípicas, en personas con una predisposición endógena, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales (dieta, ejercicio, etc.) (Martínez-Sesmero y Sánchez-Muniz, 2005).

Estudios recientes sugieren que el SM puede originarse incluso desde la etapa de desarrollo fetal (Levitt y Lambert, 2002; Ozanne y Hales, 2002; Falkner y col., 2002). En este sentido, hay que destacar que Falkner y col. (2002) describieron por primera vez el SM en un paciente pediátrico. El riesgo de aterosclerosis y la definición de SM en niños han comenzado a recibir una mayor atención por parte de la comunidad científica (Fagot-Campagna y col., 2000; Kohen-Avramoglu y col., 2003), debido principalmente al aumento de la prevalencia de DM2 en niños obesos (Ehtisham y col., 2000; Alexander y col., 2003; Juonala y col., 2006) y la relación encontrada entre la magnitud de la aterosclerosis aórtica y coronaria y algunos factores de RCV en niños. (Alberti y Zimmet, 1998; Juonala y col., 2006). Todo ello ha hecho cambiar la percepción de que las complicaciones de la obesidad sólo se desarrollan si ésta persiste durante la vida adulta.

Aunque las causas del SM no están certeramente elucidadas, numerosos grupos han intentado definir sus componentes esenciales. No existe una definición de SM para el adulto consensuada internacionalmente; sin embargo, desde un punto de vista práctico y

eminentemente clínico, los parámetros más extendidos para identificar y diagnosticar el SM son los propuestos por el *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP-III, Alexander y col., 2003). Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS, Alberti y Zimmet, 1998), el *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) (Balkau y col., 2002, Balkau y Charles, 1999), y la *International Diabetes Federation* (IDF) (Alberti y Zimmet, 2005) también han formulado sus propias definiciones. Cada uno de estos criterios se apoya en parámetros diferentes, aunque en todos ellos pueden combinarse la hiperglucemia, la hipertrigliceridemia, los niveles reducidos de HDLc y la obesidad central. Por otro lado, en 2007, la IDF (Zimmet y col., 2007a, 2007b) estableció unos criterios específicos para niños y adolescentes hasta 16 años, ya que a partir de esta edad, los criterios coinciden exactamente con los del adulto. En la Tabla 1.4 se resumen los criterios diagnósticos de SM anteriormente citados:

**Tabla.1.4.** Puntos de corte propuestos para definir SM en niños y adolescentes.

<b>Factor de riesgo</b>	<b>NCEP ATP-III (adultos) (1)</b>	<b>Cook y col. (2)</b>	<b>De Ferranti y col. (3)</b>	<b>IDF (10-16 años)(4)</b>
Perímetro de cintura (cm)	102 (H) 80 (M)	$\geq P_{90}$	$\geq P_{75}$	$\geq P_{90}$ ó >adultos si es menor: 94(H),80(M)
TG (mg/dL)	$\geq 150$	$\geq 110$	$\geq 100$	$\geq 150$
HDLc (mg/dL)	<40 (H) <50 (M)	$\leq 40$	<45 (H) <50 (M)	<40
PAS/PAD (mmHg)	$\geq 130/\geq 85$	$\geq P_{90}$	$\geq P_{90}$	$\geq 130-85$
Glucosa (mg/dL)	$\geq 110$	$\geq 110$	$\geq 110$	$\geq 100$

Adaptada de Amemiya y col. (2007). H: hombres; M: mujeres, P: percentil, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica. (1) NCEP-ATP III (2001), (2) Cook y col. (2003), (3) De Ferranti y col. (2004), (4) Zimmet (2007a, 2007b).

En el ámbito del Estudio Área de Toledo, cuando los niños cumplieron 4 años (Martínez-Sesmero y col., 2009), se postularon unos puntos de corte para la definición de SM en dicha población. En este caso la prevalencia global de candidatos para SM fue del 10,9 % (niñas 9,1%, niños 1,8%).

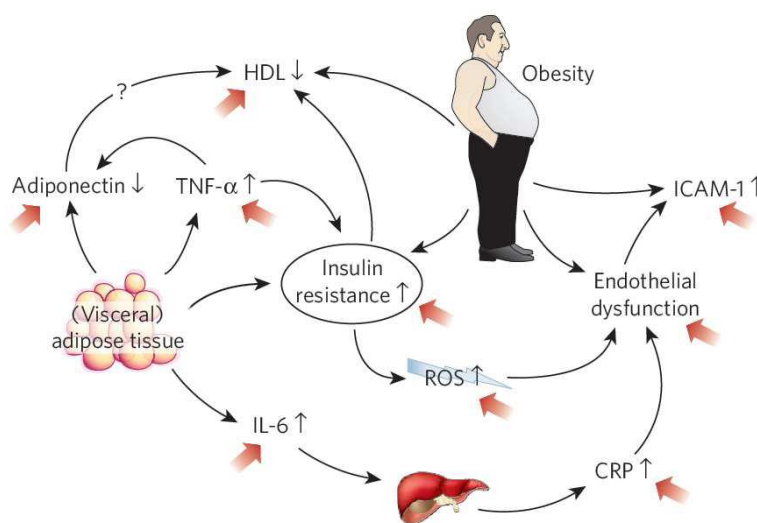
#### ETIOPATOGENIA

La fisiopatología del SM es extraordinariamente compleja, y las causas que conducen a su desarrollo son múltiples y aún no han sido bien determinadas. Los expertos coinciden en señalar a la obesidad central y la resistencia a la insulina como los principales factores etiológicos (Gupta, 2010). Sin embargo, no podemos olvidar a otros agentes causales como edad, sedentarismo, dieta y perfil genético (Anderson y col., 2001; Ukkola y Bouchard., 2001; Grundy y col., 2004; Eckel y col., 2005).



## OBESIDAD

La obesidad consiste en un aumento en número y tamaño de los adipocitos del tejido adiposo, lo que se traduce en un aumento de la masa grasa. Esta enfermedad crónica resulta de un proceso complejo y acumulativo como resultado de desequilibrio entre el ingreso y el gasto energético, la distribución de las reservas energéticas y la capacidad de adipogénesis. La obesidad es el principal factor de riesgo en la aparición de DM2 y ECV, y el factor etiológico más importante que predispone a la resistencia a la insulina y al SM (Kahn y Flier, 2000). La vía que relaciona la obesidad y la resistencia a la insulina con SM y DM2 representa un fenotipo progresivo.



**Figura 1.15.** Representación esquemática de varios mecanismos que vinculan la obesidad con la enfermedad cardiovascular. Ambos, obesidad abdominal y otros factores de RCV, como fumar, se asocian con resistencia a la insulina, estrés oxidativo y aumento de diferentes adipocitoquinas, todo lo cual conduce a la disfunción endotelial. Las flechas rojas indican el efecto de fuentes de radicales libres como fumar. Tomada de Van Gaal y col., (2006). c-HDL: colesterol transportado por HDL, TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-6: interleucina 6, ROS: especies reactivas del oxígeno, CRP: proteína C reactiva, ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular-1.

## RESISTENCIA A LA INSULINA

La insulina es una hormona sintetizada en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos que se libera al torrente sanguíneo en respuesta al aumento de la concentración de glucosa. Su función es proporcionar a las células el combustible necesario para sus funciones, favoreciendo la captación de glucosa por los tejidos e inhibiendo su producción hepática. Promueve el almacenamiento de energía en forma de grasa en el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético estimulando la lipogénesis y favoreciendo la entrada de AGL para su utilización en la síntesis de TG, estimula la síntesis de glucógeno y proteínas e inhibe los procesos de glucogenolisis y lipolisis, así como la degradación de proteínas (Saltiel y Kahn, 2001). En el músculo esquelético estimula la captación de glucosa y favorece la glucogenogénesis. Además promueve la captación y el transporte de aminoácidos y la síntesis proteica (Sakamoto y col., 2005).



La resistencia a la insulina sucede cuando hay una respuesta a esta hormona menor a la esperada. A finales de los años 60 se planteó la relación entre el aumento de los AGL y la resistencia a la insulina (Randle y col., 1963). El exceso de depósitos grasos en el compartimento intra-abdominal parece ser el detonante de la resistencia a la insulina mediante un flujo excesivo de AGL al hígado (Wilding, 2007). Este efecto se ha observado tanto en adultos como en niños (Gower y col., 1999; Goran y col., 2002; Cruz y col., 2002).

La prueba del *Clamp* hiperinsulinémico-euglucémico está considerada como la más exacta para determinar la sensibilidad a la insulina, pero requiere una infusión intravenosa constante de insulina. La glucosa sérica se ajusta al nivel normal en ayunas mediante una infusión variable de glucosa. Se requieren numerosas muestras de sangre para mantener la glucosa dentro de un intervalo de concentraciones "normal". En teoría, la infusión intravenosa de insulina debería suprimir por completo la producción pancreática de insulina, de modo que ésta no interfiera con la prueba. El grado de resistencia insulínica es inversamente proporcional a la utilización de la glucosa por los tejidos, es decir, cuanto menor es la cantidad de glucosa tomada por los tejidos, más resistente es el paciente a la insulina (Pérez Maraver y Montanya Mias, 2001; Strackowski y col., 2004). Las alternativas a esta metodología que han demostrado su utilidad para evaluar la resistencia a la insulina son el cálculo del *Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance* (HOMA-IR) (Matthews y col., 1985) y el *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (QUICKI) (Katz y col., 2000).

#### CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina conduce a multitud de anomalías metabólicas en hígado, músculo y tejido adiposo, lo que resulta en una dislipemia caracterizada por una elevación de AGL y TG, y niveles disminuidos de HDLc. Además, los individuos con un genotipo sensible son más susceptibles a los factores de estrés metabólico y pro-inflamatorios, y por tanto, tienen mayor riesgo de desarrollar SM (Phillips y col., 2006). Factores ambientales como sedentarismo, tabaquismo y algunos fármacos (diuréticos, betabloqueantes, corticoides...) también facilitan el desarrollo de resistencia a la insulina (Anderson y col., 2001; Ukkola y Bouchard, 2001; Grundy y col., 2004; Eckel y col., 2005; Wang, 2005).

La resistencia a la insulina se asocia a reconocidos factores de RCV como HTA, DM2, dislipemia aterogénica y otros factores de disfunción endotelial (Figura 1.15). La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia (comunes en el estado prediabético), preceden en varios años a la aparición de DM2. Haffner y col. (2000) demostraron que más del 82% de los individuos que desarrollaron DM2 eran previamente insulinoresistentes.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la relación entre la resistencia a la insulina y uno o varios grupos de características definitorias del SM. Cabe destacar el estudio de Chen y col. (2000) en el marco del *Bogalusa Heart Study*. Asimismo, otra cohorte del mismo estudio de Bogalusa analizada por Freedman y cols. (2007) en niños y adolescentes de 5 a 17 años, manifestó que el 39% de los participantes, con un IMC  $\geq P_{95}$ , presentaban al menos 2 factores de RCV, aumentando hasta el 59% en los que presentaron un IMC  $>P_{99}$ .

Raitakari y col. (1995) realizaron un estudio prospectivo en el que se demostró que los niños con valores mayores de insulina en ayunas eran aquellos que más tarde desarrollaban

SM, sugiriendo que la resistencia a la insulina en niños obesos podría preceder a posteriores alteraciones metabólicas y aterogénicas.

En el apartado “Generalidades del embarazo” de esta Revisión Bibliográfica se ha comentado que multitud de factores durante la gestación pueden afectar al desarrollo y maduración del páncreas, incidiendo sobre su capacidad de producción de insulina. Igualmente, la DG condiciona aspectos muy negativos en el feto. A su vez, atendiendo a lo ya comentado para la hipótesis de Barker, parece bastante consensuado el origen prenatal y perinatal de la resistencia a la insulina. No obstante, hasta la fecha no se han definido intervalos de normalidad para sensibilidad a la insulina al nacimiento y, por tanto, tampoco los puntos de corte para determinar la resistencia a la insulina en neonatos.

#### DESARROLLO PERINATAL Y SÍNDROME METABÓLICO

La expresión programación perinatal intenta explicar cómo determinadas patologías adultas crónicas no infecciosas parecen tener su origen durante el periodo de desarrollo perinatal. Refleja el hecho de cómo durante el desarrollo perinatal (periodo fetal y neonatal), factores externos al feto o al recién nacido, pueden incidir en la diferenciación de los órganos en formación, e interactuando con el genoma, provocar alteraciones que luego permanecen de forma irreversible en el organismo adulto. La programación se produce gracias a la enorme plasticidad que presentan los órganos en desarrollo, y se realiza adaptando el organismo inmaduro a factores externos para poder sobrevivir (Seckl, 2004).

#### HIPERCOLESTEROLEMIA

Durante años se pensó que la hipercolesterolemia materna durante el embarazo no sería factor de riesgo, puesto que la placenta es impermeable a las lipoproteínas que transportan el colesterol (Belknap y Dietschy, 1988) y en ausencia de factores hereditarios de hipercolesterolemia, los niveles plasmáticos de colesterol fetales no se correlacionan con los maternos. Sin embargo estudios recientes hacen pensar que esta hipótesis no es correcta, porque han demostrado que 1) en la aorta de fetos humanos prematuros ( $6,2 \pm 1,3$  meses) ya existen estrías grasas, que presentan la misma distribución que las lesiones ateroscleróticas del adulto; aunque estas lesiones eran más marcadas en fetos de madres con hipercolesterolemia previa al embarazo, también aparecían en fetos de madres que desarrollaban la hipercolesterolemia durante el embarazo, lo que sugiere que la hipercolesterolemia materna/fetal contribuiría al desarrollo de las lesiones. Los fetos también presentaban lesiones ateroscleróticas menos desarrolladas en los vasos cerebrales (arteria media y basilar) o carotídeos (Napoli y col., 1997) y 2) en fetos humanos menores de 6 meses, los niveles de colesterol plasmático fetales se correlacionan con los niveles maternos de colesterol (Napoli y col., 1997), por lo que en los estadios iniciales de la gestación la hipercolesterolemia materna podría producir una hipercolesterolemia fetal, que facilitaría la formación de estrías grasas.

Por otro lado, dado que los niveles fetales de colesterol disminuyen a partir del sexto mes de embarazo, sería posible que las estrías grasas regresaran al final del embarazo y durante una infancia normocolesterolémica. En el estudio FELIC se estudiaron las lesiones aórticas de 156 niños normocolesterolémicos con edades entre 1 y 13 años, con madres normo o

hipercolesterolémicas, que fallecieron de forma traumática (Napoli y col., 1997). Las dimensiones de las estrías grasas en el arco aórtico eran menores (64%) a los 3 años de edad que al nacimiento, pero las lesiones progresaban posteriormente, siendo este proceso más rápido en los hijos de madres hipercolesterolémicas. Ello sugiere que la hipercolesterolemia materna facilitaría la formación de estrías grasas en el feto y la posterior aparición de lesiones ateroscleróticas en la edad adulta y que el control de la hipercolesterolemia materna durante el embarazo podría prevenir/retrasar este proceso (Palinski y Napoli, 2000).

#### HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La OMS ha identificado la HTA como el problema de salud pública más importante por su prevalencia (28,4% de la población adulta), ser el factor de riesgo de ECV más frecuente en los pacientes mayores de 50 años y las complicaciones que conlleva. Muchos estudios experimentales y clínicos han demostrado que los hijos de madres que han sido expuestas a una restricción dietética durante la gestación presentan cifras más elevadas de presión arterial sistólica/diastólica (Tamargo Menéndez, 2008). La HTA es una manifestación de los trastornos metabólicos asociados con resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Börjesson y Dahlöf, 2005). La evidencia apunta a que la HTA es consecuencia y no causa de la insulinoresistencia (Fujita y col., 1992; Després y col., 1996). La resistencia a la insulina es más prevalente en hipertensos que en la población general, aunque no todos los pacientes con resistencia a la insulina desarrollan HTA (Falkner y col., 1999). El 50% de los obesos desarrollan HTA en algún momento de la enfermedad (Zachary y Bloomgarden, 2003) siendo la interrelación entre obesidad, resistencia a la insulina y HTA compleja y multifactorial. No obstante, dado que no se ha estudiado en la presente memoria la tensión arterial no insistiremos más en este aspecto.

#### DIETA MEDITERRÁNEA

Aunque no existe una definición totalmente aceptada de Dieta Mediterránea, se reconoce como el patrón de alimentación tradicional que caracterizaba a los países de la cuenca del Mediterráneo hacia la mitad del siglo XX (Márquez-Sandoval y col., 2008). Según los principales recursos alimentarios de cada país, hay variaciones en el consumo de los componentes de la Dieta Mediterránea tradicional, (Serra-Majem y col., 2004) pero todos se acercan a este patrón común (Buckland y col., 2008). La Dieta Mediterránea forma parte de un estilo de vida que incluye tanto el uso de ingredientes tradicionales como la elaboración de las comidas de una forma característica. La combinación de sus elementos proporciona una dieta que ha demostrado ser saludable (Serra-Majem y col., 2004). La Dieta Mediterránea se basa en una alimentación equilibrada y versátil, junto con unos hábitos de vida y cultura que contribuyen a potenciar la calidad de vida, la salud y la longevidad (Serra-Majem, 2001a; Serra-Majem y col., 2003a; Trichopoulou y col., 2003; McCarty y col., 2004; Sánchez-Muniz, 2007; Estruch y col., 2013).

La consideración de la Dieta Mediterránea como dieta saludable surgió a partir de estudios nutricionales realizados en Grecia en la década de los 50 del siglo XX, donde se detectó una mayor esperanza de vida y una incidencia de arteriosclerosis, ECV y enfermedades

degenerativas inferior a la media en otras poblaciones (Keys y col., 1984, 1986; Sánchez-Muniz, 2007). Basándose en estos antecedentes, entre 1958 y 1964 desde la Universidad de Minnesota se realizó el "Estudio de los Siete Países" (Keys, 1970), para investigar los hábitos dietéticos de siete países entre los que figuraban cinco países no mediterráneos (Estados Unidos, Japón, Finlandia y Holanda), y tres mediterráneos (Yugoslavia, Italia y Grecia) (Keys y col., 1986). Tras 15 años de seguimiento, se observó que en los países mediterráneos la esperanza de vida era mayor, y que presentaban una menor incidencia de mortalidad coronaria, lo que ponía de manifiesto las características saludables del patrón dietético que seguían estos participantes. También se evidenció que la característica principal que diferenciaba la Dieta Mediterránea era la relación entre el consumo de AGM y AGS, ya que a mayor consumo de AGM y menor consumo de AGS, menor mortalidad cardiovascular. A través de este estudio, Ancel Keys definió por primera vez el concepto de Dieta Mediterránea: *“La Dieta Mediterránea se caracteriza por un elevado consumo de pan, legumbres, arroz, frutas y verduras. Es fundamental la utilización de aceite de oliva, así como típico un consumo moderado de vino en las comidas. Abundante en frutos secos y pescado, la Dieta Mediterránea es escasa en carnes rojas y grasas de la leche”*. (cita tomada de Ortega-Azorín, 2011) Además, Keys reconoce la importancia del *“estilo de vida mediterráneo”* que se caracteriza por una personalidad más tranquila, libre de estrés, con siesta tras las comidas, alto grado de comunicación entre los habitantes de los pueblos y elevado apoyo social, tradiciones culinarias familiares relacionadas con comidas en casa y consumo habitual de alimentos poco procesados, frescos y de temporada, alto grado de ejercicio físico en las labores del campo, y clima suave que favorece los paseos al sol y el ejercicio en forma de actividades lúdicas en grupo (generalmente juegos de pelota) y entrenamiento al aire libre todo el año.

De acuerdo con los resultados originales, tras 25 años de seguimiento de la mortalidad de las mismas cohortes, se mostró de forma aún más convincente que aunque en algunas poblaciones había alguna asociación entre CT y mortalidad por enfermedad coronaria, la mortalidad absoluta por enfermedad coronaria era marcadamente diferente: a concentraciones de CT de 200 mg/dL, la tasa de mortalidad por enfermedad coronaria en Japón y los países mediterráneos del sur de Europa era del 4-5%, en USA del 12% y en el Norte de Europa del 15%. Además de los niveles absolutos conferidos a una misma concentración de CT, la pendiente de la relación entre la concentración de CT y mortalidad variaba sustancialmente con apenas aumento en la mortalidad frente a grandes variaciones en las concentraciones de CT en Japón y el Mediterráneo (Menotti y col., 1993; Verschuren y col., 1995; Massaro y col., 2006).

En enero de 1993, en la *International Conference on the Diets of the Mediterranean* que tuvo lugar en Cambridge (USA) se inició la elaboración de una serie de guías alimentarias que reflejaban la variedad de las tendencias tradicionales que históricamente se habían relacionado con una mejor calidad de vida. De esta manera, se definió en la literatura científica el concepto de *“Dieta Mediterránea tradicional óptima”* (Willett y col., 1995).

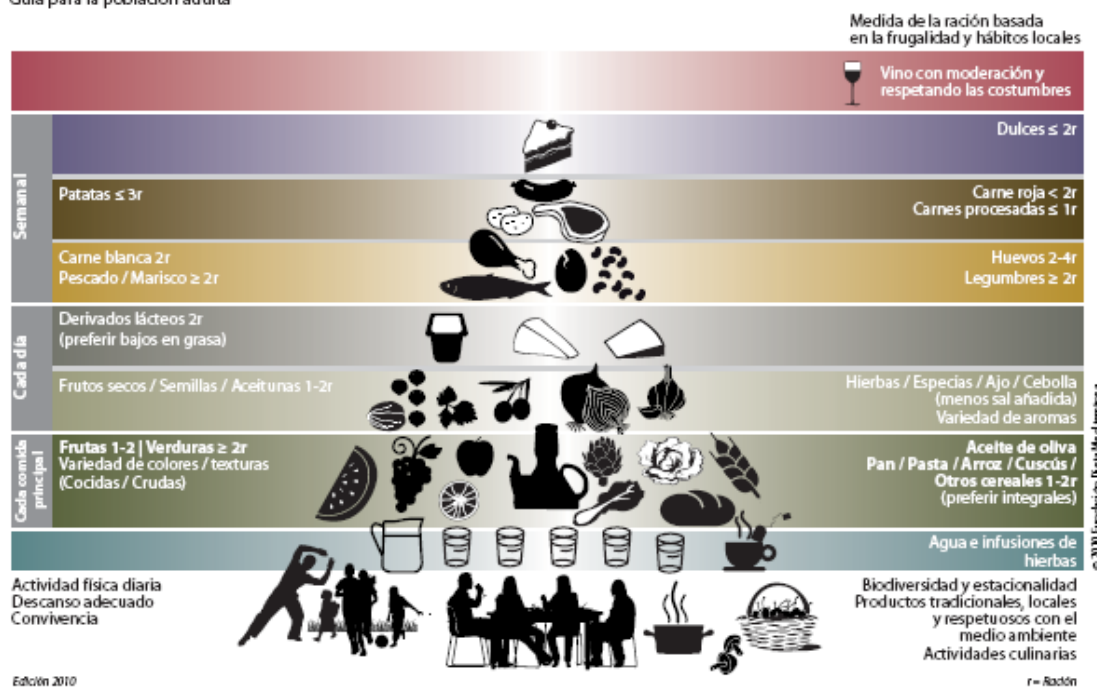
La Dieta Mediterránea ha sido reconocida por la UNESCO como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (UNESCO, 2010). El objetivo de esta iniciativa de los gobiernos de España, Italia, Grecia y Marruecos, bajo la coordinación de la Fundación Dieta Mediterránea

fue, salvaguardar el inmenso legado cultural que supone la Dieta Mediterránea así como compartir y difundir internacionalmente sus valores y beneficios (Bach Faig y Serra Majem, 2013).

Recientemente se ha publicado una nueva pirámide (Bach-Faig y col., 2011) con el patrón de Dieta Mediterránea, que aporta elementos clave para la selección de alimentos, indicando las porciones relativas y la frecuencia de consumo de los principales grupos de alimentos. También destaca la actividad física, descanso adecuado y convivencia sana. Esta pirámide puede considerarse un estilo de vida actual que se plantea desde el consenso internacional teniendo en cuenta la evidencia científica en el campo de la nutrición y la salud, así como la forma de vida actual y las amenazas al medio ambiente del modelo alimentario actual. Contribuye así a la armonización de los instrumentos educativos que se utilizan en la promoción de la Dieta Mediterránea y responde a la necesidad de un marco común entre los países mediterráneos. (Bach Faig y Serra Majem, 2013) (Figura 1.16)

## Pirámide de la Dieta Mediterránea: un estilo de vida actual

Guía para la población adulta



ICAF  
International Commission on the  
Anthropology of Food and Nutrition



Predimed  
Asociación con Dieta Mediterránea



**Figura 1.16.** Versión española de la nueva pirámide de la Dieta Mediterránea. Adaptado de Bach-Faig y col. (2011)

Son típicos de la Dieta Mediterránea los platos únicos compuestos por legumbres o cereales acompañados de una pequeña porción de carne, tocino y/o embutido (potaje, cocido, puchero, arroces...)

Los individuos que se adhieren a los principios de una dieta tradicional mediterránea tienen mayor calidad y esperanza de vida, y reducen la probabilidad de morir de ECV o cáncer (Sofi y col., 2008). Gran parte de los efectos beneficiosos asociados a la Dieta Mediterránea se atribuyen a su elevado contenido en AGM, sustancias antioxidantes (Márquez-Sandoval y col., 2008; Sánchez-Muniz, 2007), fibra y moléculas polifenólicas (Pérez-López y col., 2009). Así, el “alimento estrella” dentro de la Dieta Mediterránea es el aceite de oliva (Sánchez-Muniz, 2007), seguido del consumo moderado de vino (que aporta gran cantidad de polifenoles), frutos secos (AGM y AGP  $\omega$ -3), legumbres, verduras, fruta (todas ellas con alto contenido en fibra y antioxidantes), además de especias (ricas en compuestos bioactivos). Sin olvidar los cereales (pan y pasta) como componente obligado y de alto consumo en la dieta.

Entre los factores propios de la Dieta Mediterránea más estudiados están la grasa total y sus AG específicos en cada caso, alcohol, hidratos de carbono y el aporte total de energía en balance metabólico con el grado de actividad física individual (Corella y col., 2001; Ordovás y col., 2002; Dwyer y col., 2004).

En cuanto al consumo de aceite de oliva virgen, diversos estudios han indicado los posibles efectos beneficiosos que posee sobre la presión arterial, la hemostasis, la activación endotelial, la inflamación o la termogénesis, efectos atribuidos tanto a su alto contenido en AGM (ácido oleico), como a los compuestos fenólicos y otros componentes minoritarios con una potente acción antioxidante (Larsen y col., 1999; Tsimikas y col., 1999; Ferrara y col., 2000). No se debe olvidar que el uso de aceite de semillas en lugar de aceite de oliva para cocinar, haría que la dieta, aunque rica en productos vegetales, dejara de considerarse mediterránea, ya que no se podrían alcanzar los objetivos nutricionales de la SENC (Ros, 2001): a) los AGM deben ser mayoritarios en la dieta y constituyan entre el 15 y el 20% de la energía total, b) los AGP no deben superar el 6% del contenido calórico de la dieta por su mayor sensibilidad a la oxidación y c) el equilibrio entre AG $\omega$ 3/ $\omega$ 6 debe estar entre 4:1 y 10:1 (Sánchez-Muniz y Bastida, 2013).

Respecto al vino, desde el fenómeno de la “paradoja francesa”, diversos estudios han indicado el efecto protector frente al desarrollo de ECV que presenta su consumo moderado, por el alto contenido en sustancias antioxidantes y componentes minoritarios (Rodríguez Artalejo y col., 1998; Van der Gaag y col., 2000; Estruch, 2000; Blanco-Colio y col., 2000; Di Castelnuovo y col., 2002; Pulido y col., 2003; Watzl y col., 2004; Sánchez-Muniz, 2007; Márquez-Sandoval y col., 2008).

Los frutos secos enriquecen el perfil graso de la dieta aportando ácidos grasos insaturados (AGM en almendras y avellanas, AGP en nueces y piñones), entre los que destaca el ácido linoleico (AGP  $\omega$ -6). Además, las nueces y los piñones poseen en su composición ácido  $\alpha$ -linolénico (AGP  $\omega$ -3), al que se le atribuye un importante efecto antiaterogénico (Kris-Etherton y col., 1999; Nus y col., 2004; Simopoulos 2010; Coleman y col., 2011). Los frutos secos también son muy ricos en gran cantidad de compuestos con propiedades beneficiosas frente al RCV (Sabaté y col., 2006; Salas-Salvadó y col., 2006), como proteínas vegetales, fibra, vitamina E, polifenoles, y fitoesteroles. Cabe destacar el ácido fólico, que contribuye a reducir el nivel de tHcys (Ganji y Kafai, 2003) y la arginina como precursor del óxido nítrico (Cuevas y Germain, 2004). También han suscitado cierta preocupación en relación a la posible ganancia de peso



por su alto contenido energético; sin embargo, estudios preliminares de corta duración han mostrado que la incorporación a la dieta de hasta 50 g diarios de frutos secos no produce un aumento de peso, debido probablemente a su efecto saciante, así como por la discreta malabsorción de grasas que inducen (García-Lorda y col., 2003; Nus y col., 2004; Canales y col., 2007).

Los cereales son otro de los pilares de la Dieta Mediterránea tradicional. De ellos proviene un aporte importante de hidratos de carbono, fibra dietética y proteína de origen vegetal, además de vitaminas del grupo B, y un gran número de minerales, principalmente sodio, potasio, magnesio, fósforo, hierro y zinc, contribuyendo en gran parte al aporte energético total (Márquez-Sandoval y col., 2008).

Las legumbres también aportan un alto contenido en hidratos de carbono, proteínas de origen vegetal y fibra, así como cantidades considerables de ácido fólico,  $\beta$ -carotenos, vitaminas A y C. Son muy ricas en calcio, magnesio, potasio y fósforo. Por su alto contenido en fitosteroles e isoflavonas podrían contribuir a reducir los niveles de CT y el riesgo de ciertas enfermedades crónicas. Las frutas, verduras y hortalizas aportan agua, hidratos de carbono, fibra dietética, minerales y vitaminas, así como otros componentes minoritarios y elementos bioactivos. Se ha demostrado que la fibra dietética incrementa la sensación de saciedad, lo que conduce a la finalización de la ingesta por la inhibición del hambre a través de diversos mecanismos (masticación prolongada, incremento de la distensión gástrica, aumento de liberación de colecistoquinina) (Schröder, 2007). Tiene una función determinante en la fermentación, el perfil y tipo de la flora microbiana que determina las características personales de la flora intestinal. También reduce la densidad energética de la dieta, fundamental en la ganancia de peso, ya que un alimento con alta densidad energética tiene menor efecto sobre el control del apetito, favoreciendo un mayor consumo. La fibra dietética presenta interesantes efectos de protección cardiovascular (Sánchez-Muniz, 2012) que explican al menos en parte, los beneficios de la Dieta Mediterránea.

Las especias son otro componente fundamental de la Dieta Mediterránea, ya que además de dar aroma y sabor a los platos, aportan multitud de compuestos minoritarios bioactivos, muchos de ellos con acción antioxidante (Márquez-Sandoval y col., 2008), contribuyen a la mejor conservación de los alimentos y a la seguridad alimentaria (Sánchez-Muniz, 2013).

El pescado y sus derivados constituyen una fuente importante de nutrientes, especialmente proteínas de alto valor biológico, grasa, con una notable proporción de AG esenciales, vitaminas y minerales. También tiene mayor proporción de agua que la carne. El pescado tiene lípidos que contienen AGP  $\omega$ -3 ausentes en la mayor parte de los aceites y grasas consumidos habitualmente, entre los que destacan EPA y DHA, que pueden prevenir el desarrollo de factores de RCV mediante su acción por diversos mecanismos metabólicos (Sánchez-Muniz y Bastida, 2013; Valenzuela Bonanome y Uauy Dagach, 2010). El consumo de pescado parece proteger frente a la muerte por enfermedad coronaria. En 2001 y como parte del estudio EPIC, se reportó que la ingesta habitual de pescado se refleja en el contenido de EPA y DHA en suero y en las fracciones de CE y PL; las concentraciones de AG $\omega$ -3 son biomarcadores útiles de la ingesta de pescado (Amiano, 2001). Si bien muchos de los beneficios del consumo de pescado se han relacionado con su contenido en AG  $\omega$ -3 (Tur y col.,

2012), hay evidencias científicas que demuestran el papel que las proteínas ejercen *per se* (Vázquez y Sánchez-Muniz, 1994) o potenciando los efectos de los AG  $\omega$ -3 sobre la ECV (Sánchez-Muniz y col., 2003). Un estudio finés demostró que el consumo de pescado blanco al menos 4 veces por semana reduce los niveles de presión arterial en pacientes con ECV. (Erikilä, 2008). De Mello y col. (2009) demostraron que una dieta rica en pescado magro podría mejorar la función endotelial gracias a los cambios en la composición de los AG séricos.

La Dieta Mediterránea también incluye alimentos cuyo consumo ocurre de manera excepcional o prudente. Entre ellos se encuentran las carnes rojas, ricas en proteínas de alto valor biológico, y los lácteos, fundamentalmente los quesos magros. Deben formar parte de una dieta sana y equilibrada, pero en cantidad muy moderada debido a su alto contenido en AGS (Willett y col., 1995; SENC, 2004). Se ha demostrado ampliamente que los AGS de la dieta aumentan los niveles de CT, favorecen los procesos ateroscleróticos y tienen efecto sobre la tensión arterial (Lahoz y col., 2000; Mensink y col., 2003). También se ha definido la relación entre consumo de AGS y la resistencia a la insulina (Vessby y col., 2001), lo que redundaría en los aspectos positivos de la Dieta Mediterránea ya comentados, teniendo en cuenta el contenido correcto en AGS de esta dieta (Keys y col., 1986). Considerando que la composición de las grasas varía según el tipo de carne, las más recomendables son las más magras (caza, pollo, pavo y conejo), con un contenido graso inferior al 10% (Mata y col., 1994; Plaza Pérez y col., 2000). En cuanto a las carnes rojas, con un mayor porcentaje de grasa (cordero, cabrito, cochinillo), así como los embutidos y derivados, deberán consumirse de manera excepcional por su elevado aporte calórico (Mata y col., 1994).

Los lácteos, en la Dieta Mediterránea tradicional eran mayoritariamente de cabra, con un perfil de AG más parecido al de la leche humana y por ello más saludables. Los derivados lácteos más consumidos y característicos (por el tipo de clima), principalmente son en forma de queso y yogur. Constituyen una importante fuente de calcio en los países mediterráneos, habiéndose señalado algunos beneficios de este mineral sobre la presión arterial (Cervera Ral y col., 2001) y la colesterolemia (Sánchez-Muniz y col., 2013b). Las proteínas de origen lácteo tienen alto valor biológico por su contenido en aminoácidos esenciales y elevados coeficientes de digestibilidad. El alto contenido en AGS de las dietas occidentales actuales ha llevado a aconsejar el control del consumo de lácteos. No obstante, un tercio de sus AGS son de cadena corta y media, lo que no presenta relación con la potencialidad aterogénica y trombogénica atribuida a los AGS de cadena larga (Sayago-Ayerdi y col., 2008).

Aunque la leche, carne y grasa de animales rumiantes contienen AG *trans* como el conjugado del ácido linoleico (CLA), al que se han atribuido beneficios sobre el peso corporal y el metabolismo del colesterol, existen publicaciones que señalan efectos negativos relacionados con el consumo de estas grasas (Tepstra, 2004). No obstante, su consumo supone dentro de la Dieta Mediterránea clásica menos del 1% de la energía total.

Los alimentos de alto contenido energético, ricos en AGS, como los productos de repostería, pastelería y bollería industrial deberán consumirse de forma muy ocasional (Willett y col., 1995; SENC, 2004). Estos productos, junto con las bebidas carbonatadas y/o azucaradas, contienen azúcares simples con alto aporte de energía, calorías vacías y que facilitan el desarrollo de resistencia a la insulina, y de sobrepeso y obesidad, sobre todo en la población



que presenta una mayor frecuencia en su consumo, como es la adolescente (Flight y Clifton, 2006). Además, hay que tener en cuenta las cantidades considerables de grasas *trans* (producidas a partir de la hidrogenación parcial de los AG o por la utilización de aceites industriales que las contienen) en productos de pastelería, bollería y grasas industriales, margarinas “duras”, fritos tipo aperitivo y alimentos precocinados (Romero y col., 2000). Se han demostrado múltiples efectos perjudiciales de las grasas *trans* sobre el metabolismo lipoproteico, están relacionadas con el desarrollo de ECV (Katan y col., 1995; Mensink y Katan, 1993; Mensink y col., 2003), y favorecen la resistencia a la insulina (Bray y col., 2002) y el riesgo de desarrollar DM2 (Salmerón y col., 2001).

**Tabla 1.5.** Características de la Dieta Mediterránea.

Alto consumo	Consumo frecuente	Consumo moderado	Bajo consumo	Grasa culinaria
Pan Cereales integrales Frutos secos Miel Legumbres Verduras Hortalizas Fruta fresca Especias	Pescado	Lácteos: Queso y yogur Vino	Grasa saturada de lácteos: nata, mantequilla, margarina Carne: embutido curado	Aceite de oliva: cocinar y aderezo. Fritura

Hay varios mecanismos fisiológicos que podrían explicar los efectos protectores de la Dieta Mediterránea frente al aumento de peso. La Dieta Mediterránea tiene una densidad energética y una carga glucémica relativamente bajas (Willett y Leibel, 2002; Schröder, 2007) en comparación con otros modelos dietéticos. Estas características, junto con su alto contenido en agua, producen un incremento de la sensación de saciedad y un menor consumo de energía, lo que contribuye a prevenir la ganancia de peso. Algunos grupos han mostrado cierta preocupación por los efectos que el contenido relativamente alto en grasas de la Dieta Mediterránea (más del 30% de la energía) podrían tener sobre el aumento de peso (Ferro-Luzzi y col., 2002). No obstante, existe cierta evidencia de que la principal causa de obesidad no es tanto la cantidad de grasa de la dieta (McManus y col., 2001; Willett y Leibel, 2002; Esposito y col., 2003) como su calidad, ya que el consumo de AGM, como el ácido oleico, en lugar de AGS puede conducir a pérdida de peso (Piers y col., 2003; Sánchez-Muniz, 2007), probablemente promovido por un aumento de la oxidación lipídica y del gasto energético diario comparado con otras grasas (Buckland y col., 2008).

#### DIETA MEDITERRÁNEA Y EMBARAZO.

Como se ha comentado en la sección “Generalidades del embarazo” de esta Revisión Bibliográfica, el periodo gestacional es una etapa de máxima vulnerabilidad nutricional, por lo que una adecuada alimentación es necesaria para evitar la aparición de enfermedades de origen nutricional tanto en la madre como en su hijo, y asegurar un buen crecimiento y desarrollo. Las recomendaciones nutricionales para las gestantes han variado con el tiempo,

de modo que la alimentación actual pretende no sólo la ausencia de enfermedad materna y fetal, sino procurarles un estado de salud óptimo. Por eso los requerimientos clásicos de macro y micronutrientes se están ampliando a otros componentes funcionales: antioxidantes, AGP, fibra dietética, aminoácidos no proteicos, compuestos de acción prebiótica y probiótica; si bien no existen aún recomendaciones sobre cantidades concretas de cada uno de ellos, por la necesidad de evidencia científica al respecto.

Dada la variedad de alimentos que comprende, la Dieta Mediterránea será siempre muy aconsejable durante toda la gestación. La necesaria ganancia de peso de la gestante ha generado la aparición de mitos incorrectos, así como cambios en el estilo de vida, hábitos de consumo y tipo de alimentación de este colectivo, lo que hace necesario establecer pautas claras de información veraz, que hagan fácil y posible una alimentación óptima durante esta etapa tan importante de la vida.

Aunque se tienda a eliminar o disminuir algunos grupos de alimentos durante la gestación por miedo a una ganancia de peso excesiva, la Dieta Mediterránea es lo suficientemente rica y variada para compensar los aportes de unos alimentos con otros. Además cumple con todos los Objetivos Nutricionales, siendo la dieta más adecuada en esta situación fisiológica sin ningún tipo de duda, en base a las evidencias científicas actuales.

Dada la relación AGS/hidratos de carbono de la Dieta Mediterránea y la relación de este cociente con el marcador de resistencia a la insulina HOMA-IR (Smith y col., 2012), puede sugerirse que la Dieta Mediterránea también sería adecuada para evitar un incremento marcado de la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperglucemia en gestación, y particularmente al final del embarazo. Es muy posible que este aspecto redunde en la homeostasis fetal de la glucosa y en la glucemia al nacimiento. Además, este aspecto constituye un aspecto novedoso a estudiar, ya que no existe prácticamente información científica contrastada al respecto.

#### ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Entre los parámetros que evalúan la calidad de la dieta y su posible relación con las enfermedades degenerativas se encuentra el índice de ADM. Se han utilizado diferentes criterios para definir dicha adherencia. El primero fue establecido por Trichopoulou y col. en 2003. Posteriormente se han definido otros índices, pero en todos los casos siempre se encuentran, básicamente, las mismas premisas.

En este sentido, se llevó a cabo en España un estudio epidemiológico de intervención a gran escala, denominado PREDIMED. Es el acrónimo de PREvención con Dieta MEDiterránea y responde a un estudio aleatorizado, multicéntrico y de grupos paralelos financiado por el Instituto de Investigación Carlos III. Se trabaja con participantes exentos de ECV a los que se les ha asignado un grupo de intervención dietética:

- a) recomendaciones de Dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen,
- b) recomendaciones de Dieta Mediterránea suplementada con frutos secos,
- c) dieta baja en grasas.

A estos tres grupos de intervención se les ha realizado un seguimiento para analizar los efectos sobre el riesgo de complicaciones cardiovasculares mayores. Así, a través de este estudio se evalúa la influencia del grado de ADM y el desarrollo de fenotipos intermedios, entre los cuales se encuentra la obesidad, y fenotipos finales de ECV.

PREDIMED utiliza el índice de ADM de 14 puntos definido en la Tabla 1.6 (Estruch y col., 2006; Salas-Salvadó y col., 2011).

Los participantes que siguieron los patrones de Dieta Mediterránea suplementada registraron una reducción del riesgo absoluto en aproximadamente 3 eventos cardiovasculares mayores por 1000 personas/año, para una reducción del riesgo relativo de aproximadamente el 30% entre las personas de alto riesgo que inicialmente no padecían ECV. Estos resultados avalan los beneficios de la Dieta Mediterránea en la reducción del RCV.

Se observaron resultados significativos en accidente cerebrovascular (ACV) y eventos cardiovasculares combinados, pero no para infarto de miocardio aislado. Esto podría deberse a un mayor efecto sobre los factores de riesgo específicos para ACV y también a un menor poder estadístico para detectar los efectos en el infarto de miocardio. Los resultados del estudio coinciden con los de otros trabajos en cuanto a los efectos de protección y prevención cardiovascular que tiene la Dieta Mediterránea (Esposito y col., 2004; Salas-Salvadó y col., 2008; Mente y col., 2009; Sofi y col., 2010; Kastorini 2011a), así como con los que muestran una relación inversa entre Dieta Mediterránea y ACV (Sofi y col., 2010; Kastorini y col., 2011b).

Múltiples estudios han demostrado que los niños y jóvenes han disminuido su ADM (Kontogianni y col., 2008; Rodrigues y col., 2008; Van Diepen y col., 2010; Bondia-Pons y col., 2010; Sánchez-Benito y col., 2010,). La ADM está inversamente asociada con factores de riesgo individuales, pero sobre todo con la suma de ellos (obesidad, HDLc bajo, LDLc alto, HTA) (Sánchez Tahina y col., 2008), así como la incidencia de ECV en adultos sanos (Sofi, 2009; Buckland y col., 2009; Martínez-González y col., 2010). Por el contrario, una alta ADM se asocia con un riesgo significativamente menor de padecer SM en una población con alto RCV (Babió y col., 2009).

Abete y col. (2011) señalan que las legumbres, el aceite de oliva y el vino tinto son tres alimentos mediterráneos que se incluyen como parte del patrón dietético y que tienen efectos sobre la resistencia a la insulina. Las legumbres por su contenido en hidratos de carbono complejos, fibra soluble, magnesio y potasio tendrían efecto disminuyendo la glicemia postprandial y mejorando el control glucémico. Los componentes fenólicos y los AGM del aceite de oliva ejercerían sus efectos beneficiosos sobre la sensibilidad a la insulina, mientras que los antioxidantes del vino, principalmente el resveratrol, ejercerían sus efectos beneficiosos disminuyendo la absorción de hidratos de carbono y los niveles de insulina, y posiblemente disminuyendo el acúmulo de lípidos en el hígado.

**Tabla 1.6.** Detalle de los criterios tomados en consideración en el Índice de Adherencia a la Dieta Mediterránea\*

	<b>Criterios para obtener 1 punto</b>
Uso de aceite de oliva como principal grasa culinaria	Sí
Cantidad de aceite de oliva consumida por día incluyendo aceite utilizado para fritura, ensaladas, comidas fuera de casa, etc.	≥4 cucharadas soperas
Raciones de vegetales al día (1 ración=200 g). Considerar la guarnición como media ración	≥2; ≥1 porción cruda o como ensalada
Unidades de frutas, incluyendo zumos naturales de frutas por día	≥3
Raciones de carne roja, hamburguesas, o productos cárnicos (jamón, salchichas, etc) por día	<1
Raciones de mantequilla, margarina o nata consumidas por día (1 ración=12 g)	<1
Número de bebidas azucaradas o carbonatadas por día	(<1)
Raciones de vino por día (1 ración=150g)	≥1 vaso
Raciones de legumbres por semana (1 ración=150 g)	≥3
Raciones de pescado o marisco consumidos por semana (1 ración=100-150g de pescado o 4-5 unidades de 200 g de mariscos)	≥3
Raciones de dulces comerciales (no hechos en casa) galletas, magdalenas, etc por semana	<3
Raciones de nueces o frutos secos (incluyendo piñones) por semana (1 ración=30 g)	≥3
Consumo de pollo, pavo, conejo en vez de cerdo, carne de vacuno, hamburguesa o salchichas	Sí
Veces por semana de vegetales, pasta, arroz, o platos sazonados con sofrito (salsa preparada con tomate, cebolla, ajo, y aceite de oliva)	≥2

\*Este ADM es una transcripción del ADM de 14 puntos de Estruch y col. (2006). Los datos se expresan en parte comestible.

En la revisión de Richard y col. (2015), se muestra un resumen de los estudios en los que no se encontraron pérdidas de peso pero sí modificaciones sobre otros componentes del SM. De los 6 estudios que se comparan, en 3 de ellos (Jula y col., 2002; Estruch y col., 2006; Richard y col., 2011) se encontraron disminuciones de los niveles de insulina, HOMA. Si bien en el trabajo de Richard los beneficios sólo se observaron en hombres con niveles basales elevados de TG, insulina y presión arterial diastólica.

## APROXIMACIÓN A GENES CANDIDATOS

La nutrición se considera el factor ambiental más importante que interactúa con los genes para incrementar o disminuir la probabilidad de desarrollar patologías metabólicas como dislipemias y DM2 y aumentar el RCV (Afman y Muller, 2006). En este contexto surgen dos conceptos: Nutrigenética y Nutrigenómica.

La Nutrigenética estudia la diferente respuesta de los individuos a la dieta en función de su genotipo (Ordovás y Mooser, 2004). Incluye la identificación y caracterización de variantes genéticas (principalmente SNPs) que se relacionan con una respuesta diferente a los componentes de la dieta o a la terapia nutricional para los fenotipos de interés (Ordovás y Corella, 2004). Su objetivo es generar recomendaciones individuales específicas en relación a los riesgos y beneficios de componentes específicos de la dieta tras la identificación de variantes genéticas para el óptimo beneficio de cada individuo. También se la conoce como “nutrición personalizada” (Ortega Azorín, 2011; Arellano Campos, 2012).

La Nutrigenómica se centra en el estudio de los mecanismos moleculares y celulares que explican la diferente respuesta fenotípica de cada individuo a la dieta, en función de las variaciones en su genotipo. Así estudia la interacción entre nutrientes y expresión génica, la caracterización de nuevas proteínas y sus funciones fisiológicas, así como sus interacciones con las diferentes concentraciones de nutrientes y de las respuestas específicas a nivel celular y sistémico, promoviendo una mejora en la comprensión de cómo la nutrición influye en las vías metabólicas y el control homeostático (Van Ommen y Sterium, 2002; Muller y Kersten, 2003; Arellano Campos, 2012). Incluye aspectos de proteómica, metabolómica, genómica comparada, y transcriptómica, y combina diferentes técnicas de biología molecular, genómica funcional, bioinformática, epidemiología, bioquímica y nutrición (Palou y col., 2004; Ortega Azorín, 2011). En nutrigenómica se emplean dos términos que conviene diferenciar: fenotipos finales y fenotipos intermedios. En el SM, por ejemplo, los fenotipos finales corresponderían al propio evento cardiovascular (IAM, muerte súbita cardíaca, ACV, aneurisma aórtico...). Los fenotipos intermedios definen el valor de indicadores, marcadores o factores relacionados con la ECV que se manifiestan antes del propio evento cardiovascular. Los más importantes serían las concentraciones de CT, LDLc, HDLc, glucosa, insulina, tHcys, marcadores de inflamación o estrés oxidativo, coagulación y disfunción endotelial, así como las medidas antropométricas. (Ordovás y Corella 2004, 2005).

La dieta desempeña una función fundamental tanto en la expresión de los fenotipos intermedios como de los finales. Las interacciones gen-dieta pueden emplearse de dos maneras:

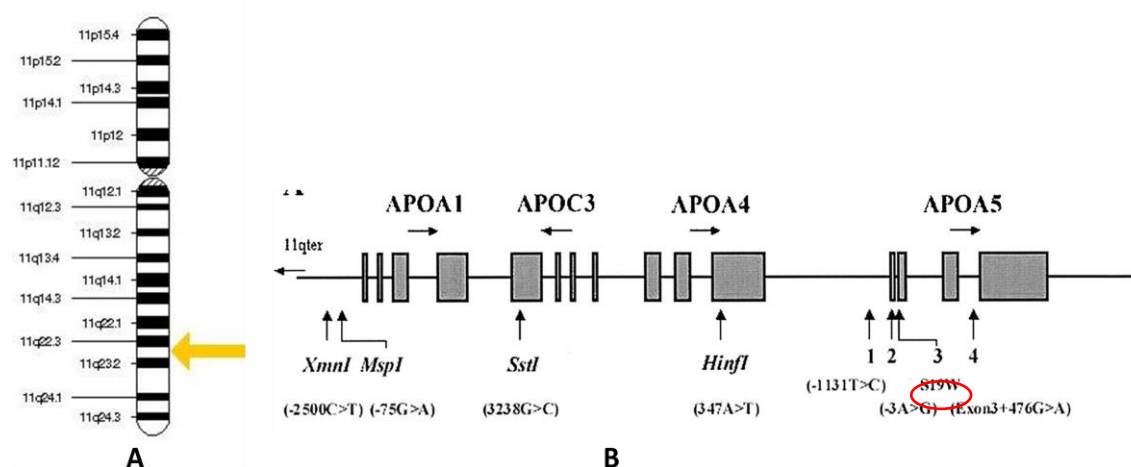
1) Interacción biológica: se da cuando dos o más factores influyen sobre un fenotipo al mismo tiempo sin implicar necesariamente una interacción estadística (Tiret, 2002). Esta interacción deberá considerarse al diseñar intervenciones dietéticas preventivas y terapéuticas para modificar fenotipos específicos en individuos genéticamente susceptibles.

2) Interacción estadística: se da cuando el grado de dirección del efecto de un factor (p.e. un SNP) difiere de acuerdo al valor de un segundo factor (p.e. un nutriente).

Ambas disciplinas tienen como objetivo desentrañar las interacciones gen\*dieta, pero el enfoque y los objetivos inmediatos son distintos (Mutch y col., 2005). La mayor parte de las investigaciones se centran en el estudio de genes candidatos ya conocidos, aunque aún no hay mucha literatura sobre los nuevos *loci* identificados en los estudios de GWA (*genome wide association*) (Ordovás, 2009).

#### GEN DE LA APO A5.

El gen de la APOA5 se descubrió en 2001 mediante modelos bioinformáticos. A partir del análisis genómico comparado de las secuencias de distintas especies, Pennacchio y col. (2001), encontraron dicho gen en humanos. Este gen se localiza en el cromosoma 11q23 (Figura 1.). Se sitúa 30 kb hacia 3' del gen APOA4 y 40 kb del APOC3 (Oliveira y col., 2008). Está tan próximo al bien caracterizado agrupamiento de genes denominado APOA1/APOC3/APOA4, que con el tiempo, ha pasado a formar parte del mismo.



**Figura 1.** (A) Localización del gen APOA5 en el cromosoma 11. (B) Situación en el agrupamiento de genes APOA1/APOC3/APOA4/APOA5. Tomada de Mar y col. (2004). Se señala en rojo la ubicación del polimorfismo estudiado en esta memoria de Tesis Doctoral.

La proteína que codifica, la Apo A5, no fue conocida hasta después de identificar el gen. Es un monómero de 39 kDa de peso molecular, y 366 aminoácidos. Tiene una alta hidrofobicidad global y un elevado contenido de estructuras en  $\alpha$ -hélice, con alta afinidad por las interfases lipídicas (Oliveira y col., 2008). Se asocia con VLDL, HDL y QM. Sus valores plasmáticos varían entre 24 y 406  $\mu\text{g/L}$ , y son significativamente inferiores a los de las otras Apos (O'Brien y col., 2005).

Se han descrito 3 haplotipos mayoritarios para el gen de la Apo A5, que constituyen el 98% de los haplotipos Apo A5 en la población blanca: Apo A5\*1 (haplotipo común), Apo A5\*2 (c.1259T>C, IVS3 + 476G>A, 1131T>C y c.-3a >G) situado en el promotor del gen, y Apo A5\*3 (c.56C>T), que implica el cambio de aminoácido S19W en la proteína. Cada uno de estos haplotipos incluye uno o más SNP (Oliveira y col., 2008). La prevalencia de estos polimorfismos varía según las poblaciones. En caucásicos oscila entre el 10 y el 15% de la población como portadores de los alelos mutados.

Desde la publicación inicial de la asociación de estos polimorfismos con mayores concentraciones de TG (Pennacchio y col., 2001), han sido múltiples los estudios realizados en distintas poblaciones en las que se han confirmado las asociaciones de estas variantes genéticas con mayor concentración de TG. Actualmente no hay duda en conceder al gen de APOA5 una importante contribución en el metabolismo de TG, e incluso se ha sugerido su participación en el almacenamiento y movilización de los lípidos intracelulares al ser localizada la APOA5 en las gotas de grasa intracelular (Shu y col., 2007). Sin embargo, la participación de la APOA5 en la regulación del peso corporal y la obesidad no es bien conocida.

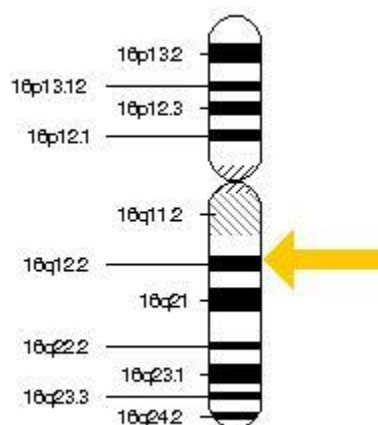
Las variaciones del agrupamiento de genes APOA1/APOC3/APOA4/APOA5 en la región cromosómica 11q23 afectan al metabolismo lipídico, sobre todo a las concentraciones plasmáticas de TG (Oliveira y col., 2008). Desde hace unos años se han publicado multitud de estudios asociando polimorfismos en este agrupamiento de genes con marcadores de obesidad. Sin embargo, como muchos de estos polimorfismos pueden estar actuando como indicadores de la verdadera variante funcional, no se puede atribuir con certeza una mayor relevancia a alguno de los genes del agrupamiento (Corella y Portoles, 2008). En 2007, Corella y col. describieron en los participantes del estudio Framingham, una interacción entre el polimorfismo -1131T>C y el riesgo de obesidad en función de la cantidad de grasa consumida en la dieta. Según esto, las personas homocigotas para el alelo mayoritario T, aumentarían su IMC a medida que elevan su consumo de grasas, lo que no ocurre en los portadores del alelo minoritario C. Al considerar el riesgo de obesidad o sobrepeso, la interacción con el consumo de grasas mantiene la significación estadística.

A fecha Diciembre 2014 no hemos encontrado ningún trabajo, excepto el que se incluye en el apartado Resultados de esta memoria de Tesis Doctoral, de nuestro equipo, que relacione el gen de la Apo A5 con marcadores antropométricos y lipoproteicos en recién nacidos.

#### GEN FTO

El gen asociado con la masa grasa y la obesidad (FTO) se localiza en el brazo largo del cromosoma 16, en la posición 12.2, y está formado por 9 exones (Frayling y col., 2007) (Figura).

Algunos estudios *in vitro* sugieren la posibilidad de que este gen tenga una función reguladora a nivel de ácidos nucleicos en humanos, catalizando la desmetilación de 3-metiluracilo en ADN de cadena sencilla, de 3-metiluracilo en ARN (Gerken y col., 2007; Jia y col., 2008; Han y col., 2010;) y N6-metiladenosina en ARN nuclear (Jia y col., 2011).



**Figura 1.** : Localización del gen FTO en el cromosoma 16.

La expresión del FTO es especialmente elevada en el hipotálamo, sugiriendo que este gen estaría implicado en el balance energético (Tung y col., 2010). La función del FTO en la homeostasis energética está avalada por varios estudios realizados en humanos y roedores, que muestran que la expresión de ARNm de *Fto* está regulada por la ingesta de alimentos (Gerken y col., 2007; Fredriksson y col., 2008; Stratigopoulos y col., 2008; Tung y col., 2010), la glucosa circulante (Poritsanos y col., 2011), el peso corporal (Wåhlén y col., 2008; Zabena y col., 2009) y la demanda energética (Stratigopoulos y col., 2008; Wåhlén y col., 2008; Fischer y col., 2009; Zabena y col., 2009; Poritsanos y col., 2011).

Se han descrito asociaciones significativas entre obesidad y 5 SNPs de FTO (Ewens y col., 2011). Otros estudios han propuesto que los alelos de riesgo relacionados con el gen FTO predisponen a DM2, HTA y ECV en poblaciones de riesgo (Freathy y col., 2008; Doney y col., 2009; Lappalainen y col., 2010)

El polimorfismo rs9939609 (T>A) se ha asociado con IMC en muchos estudios (.....), de modo que éste se vería modificado aumentando el peso corporal en 1,5 kg por cada alelo A. Así, un adulto homocigoto para el alelo A pesaría 3 Kg más que un homocigoto par el alelo T (Frayling y col., 2007).

Actualmente las investigaciones se centran en la búsqueda de interacciones entre el FTO y el estilo de vida, sobre todo en la variante rs9939609. En relación con la dieta, Sonestedt y col. (2009) encontraron una interacción significativa entre la ingesta de grasa y el genotipo FTO y entre la ingesta de hidratos de carbono y el genotipo sobre el IMC. El alelo de riesgo se ha asociado con comportamientos alimentarios peores (Frayling y col., 2007; Dina y col., 2007; Scuteri y col., 2007). Cecil y col. (2008), concluyeron, tras estudiar una amplia población, que



las variantes de FTO tenían gran influencia sobre la ingesta de alimentos y la preferencia por alimentos muy energéticos. Razquin confirmó la asociación entre peso corporal y la variante rs9939609, pero no halló interacción con la intervención dietética mediante Dieta Mediterránea (Razquin y col., 2010). Ortega-Azorín y col. (2012) encontraron que la asociación entre el polimorfismo FTO rs9939609 con DM2 está fuertemente modulada por la dieta en sujetos que presentan un patrón dietético de baja ADM. Rodríguez López y col. (2010) describen una mayor resistencia a la insulina y preferencia por dietas hipercalóricas en portadores del alelo A. Se ha sugerido también que los efectos negativos de FTO sobre adiposidad y peso corporal pueden ser compensados por altos niveles de actividad física (Andreasen y col., 2008; Rampersaud y col., 2008, Sonestedt y col., 2009, Kilpeläinen y col., 2011). Wardle y col. (2009) observaron asociación significativa en homocigotos para el alelo A no sólo en cuanto a la menor respuesta a la saciedad, sino que también describieron un efecto mediador de la respuesta a la saciedad sobre la asociación con la mayor adiposidad.

#### FTO rs9939609 EN LA INFANCIA

Varios estudios coinciden en señalar que no hay asociación significativa entre el polimorfismo FTO rs9939609 de la madre o del neonato con el peso al nacer, talla, IMC ó IP al nacimiento (Frayling y col., 2007; López Bermejo y col., 2008; Labayen y col., 2012; Haller y col., 2013). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el polimorfismo rs9939609 del gen FTO no tiene impacto sobre el consumo de energía y el metabolismo, sino sobre el comportamiento alimentario (Haller y col., 2013). A la vista de estos resultados, muchos grupos han tratado de establecer cuándo comienza el efecto del FTO sobre el IMC. Frayling y col. (2007), demostraron la asociación del polimorfismo rs9939609 con cambios en el IMC y con aumento del riesgo de obesidad infantil a los 7 años. Da Silva y col. (2013) observaron diferencias significativas en el IMC y en la ingesta de energía procedente de lípidos en niños de 4 años. Rzehak y col. (2010) no encontraron asociación entre las variantes de FTO con la ganancia de peso en las cohortes GINI y LISA al nacimiento, pero comprobaron que la asociación significativa se desarrollaba más tarde (a los 4 años) en su población. Esto coincide con los hallazgos de Velders y col. (2012), que tampoco encontraron asociación del polimorfismo rs9939609 del FTO con el IMC en población preescolar. López Bermejo y col. (2008), estudiando una pequeña muestra de neonatos a término, establecieron que a la edad de 2 semanas se pueden observar algunas diferencias asociadas con el polimorfismo rs9939609 del FTO en las medidas de IP, peso y composición de grasa corporal.

La información acerca de los efectos del polimorfismo rs9939609 de FTO sobre las concentraciones de glucosa e insulina en neonatos a término es muy escasa. (López Bermejo y col., 2008).

## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todo lo expuesto en la Revisión Bibliográfica sobre la importancia de la nutrición en el embarazo, la regulación de la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipoproteico en el recién nacido, así como la influencia de la carga genética y de la modulación de la misma por los nutrientes se puso de manifiesto la necesidad de realizar un sondeo, en una población de recién nacidos seleccionados, con el fin de establecer valores de referencia de algunos marcadores relacionados con el SM, así como para determinar la existencia de posibles efectos maternos (p.e. tolerancia a la glucosa, dieta, polimorfismos en genes candidatos) sobre las características antropométricas y metabólicas de los neonatos.

Para ello se plantaron los siguientes objetivos:

### OBJETIVO PRIMARIO

Conocer y determinar los factores nutricionales, lipoproteicos y hormonales más importantes que puedan constituirse como marcadores precoces de resistencia a la insulina y ECV en el momento del nacimiento.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

Surgen a partir del objetivo primario:

1) Revisar las investigaciones clásicas y los trabajos actuales que señalan a la gestación como época central y crítica, y en particular a la nutrición materna durante este periodo, para el desarrollo de ajustes metabólicos relacionados con la sensibilidad/resistencia a la insulina y RCV y la importancia de la nutrición materna.

Revisar las investigaciones clásicas y los trabajos actuales que señalan a la gestación como época central y crítica para el desarrollo de ajustes metabólicos relacionados con la sensibilidad/resistencia a la insulina y RCV.

2) Establecer los intervalos de normalidad de algunos parámetros relacionados con la homeostasis de la glucosa y con el metabolismo lipoproteico en una población de neonatos seleccionados por criterios de normalidad.

2.1) Establecer los intervalos de normalidad de glucosa, insulina, GH, cortisol, IGF-1, QUICKI, HOMA-IR y HOMA-IS en una población seleccionada de neonatos normopeso, nacidos a término de madres cuya tolerancia a la glucosa no se vio afectada durante el embarazo.

2.2) Establecer los intervalos de normalidad para diferentes lipoproteínas (LDLc, HDLc, VLDLc, Lp(a), LDLox, AE y tHcys en una población seleccionada de neonatos normopeso, nacidos a término.

- 3) Analizar el efecto de la concurrencia de dos componentes principales de SM (hiperglucemia/hipertrigliceridemia, hiperglucemia/HDLc disminuido) sobre marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina en sangre de cordón.
- 4) Determinar la influencia del grado de tolerancia a la glucosa de la madre durante el embarazo sobre los niveles de marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina de los neonatos.
- 5) Encontrar la posible interacción entre la hipo o hiperinsulinemia de los recién nacidos y el grado de afectación de la tolerancia a la glucosa de sus madres durante el embarazo.
- 6) Conocer la calidad de la dieta de las gestantes durante el embarazo y su influencia sobre la glucemia y la colesterolemia maternas.
- 7) Determinar la influencia de la calidad de la dieta materna durante el embarazo sobre los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina, y las concentraciones de tHcys, AE, lípidos y lipoproteínas en sangre de cordón al nacimiento.
- 8) Estudiar el efecto de los polimorfismos S19W del gen candidato APOA5 y del rs9939609 del gen candidato FTO de las madres y de los neonatos sobre parámetros antropométricos, marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina al nacimiento.
- 9) Comparar la calidad de la dieta de las gestantes y su posible efecto modulador sobre marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina en neonatos, según la concurrencia del polimorfismo rs9939609 del gen candidato FTO madre/hijo.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

##### CARACTERÍSTICAS DE LAS MADRES

Se determina: edad, peso, raza, primiparidad/multiparidad, tipo de parto, semanas de gestación, tolerancia a la glucosa, nivel de estudios, ámbito rural /urbano, colesterol, ganancia de peso en el embarazo, ingesta de energía y nutrientes, calidad de la dieta (ADM, IAS), tipo y cantidad de suplementos dietéticos durante la gestación, genotipado (APOA5 y FTO)

##### CARACTERÍSTICAS DE LOS RECIÉN NACIDOS

Se estudian en el total, así como en la población masculina y femenina de neonatos, los siguientes parámetros:

- A) Antropometría: edad gestacional, talla, peso, IMC, IP, índices de Apgar al minuto y a los 5 minutos.
- B) Homeostasis de la glucosa: glucosa, insulina, HOMA-IR, HOMA-IS, HOMA-B, HOMA-D, cociente glucosa/insulina.
- C) Metabolismo lipídico: TG, CT, VLDLc, LDLc, HDLc, Lp(a), CT/HDLc, LDLc/HDLc, cociente molar TG/HDLc, Apo A1, Apo B, Apo A1/Apo B, HDLc/Apo A1, LDLc/Apo B, AE, AE/HDLc.
- D) Factores de RCV y metabolismo de la glucosa: hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDLc. Concurrencia de niveles elevados de glucosa y HDLc disminuido, y de niveles elevados de glucosa y TG.
- E) Otros parámetros: GH, IGF-1, cortisol, cociente insulina/cortisol, hipercortisolemia.
- F) Genotipado de genes candidatos (APOA5, FTO)

##### INFLUENCIA DE LA DIETA MATERNA SOBRE EL NEONATO

Se valoran las características de la dieta de las gestantes:

- A. Contenido de macro y micronutrientes, fibra y colesterol,
- B. Contribución energética de macronutrientes y de los diferentes AG para definir el perfil calórico y lipídico de las mismas.
- C. Calidad de las dietas mediante dos índices globales: IAS y ADM, y su influencia sobre parámetros antropométricos, lipoproteicos y de la homeostasis de la glucosa.

##### INTERACCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS MATERNOS-NEONATALES

Se analiza la influencia de los polimorfismos S19W del gen APOA5 y rs9939609 del gen FTO sobre marcadores antropométricos, metabolismo lipoproteico y de la homeostasis de la glucosa.



## CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

### SELECCIÓN DEL CENTRO

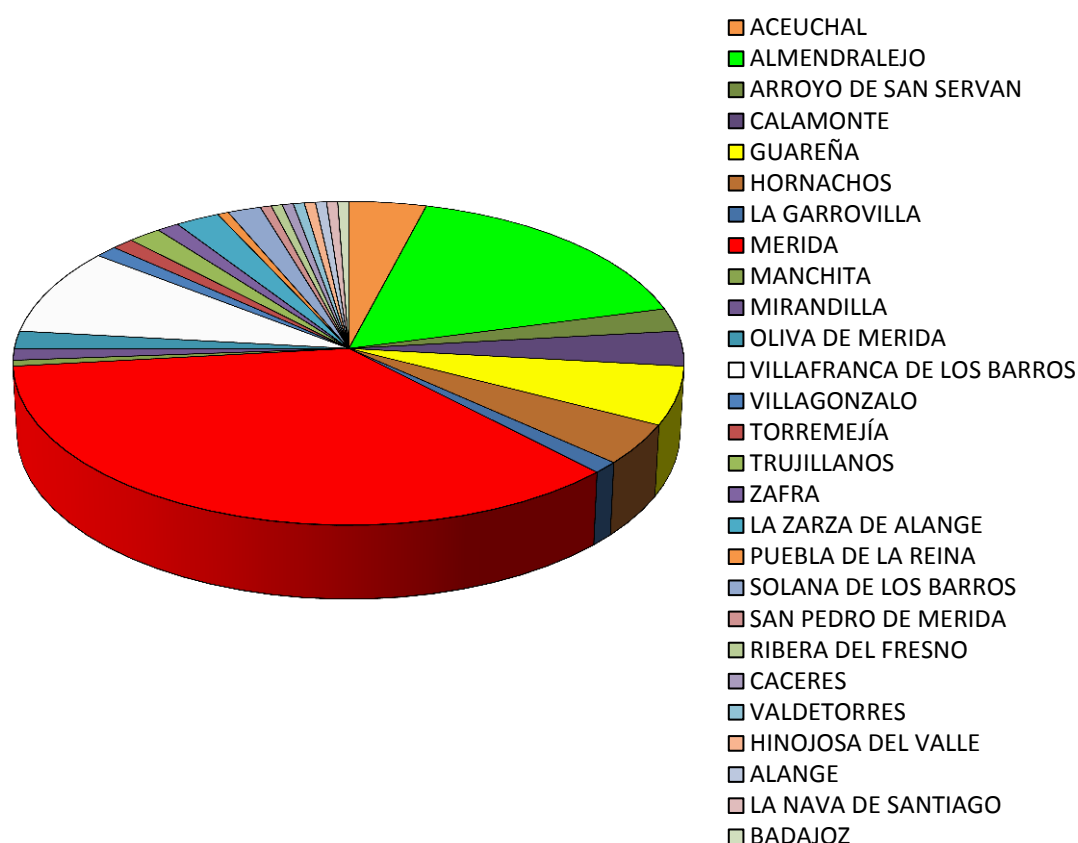
El estudio se ha realizado en el Hospital de Mérida, de la provincia de Badajoz, dependiente del Servicio Extremeño de Salud. Es un hospital de unas 400 camas y está catalogado por el Sistema Nacional de Salud como Hospital Tipo II. El área del Hospital de Mérida atiende a una población de aproximadamente 158.000 habitantes de las comarcas de Mérida y Tierra de Barros (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Comarcas de la provincia de Badajoz. Marcada la zona de influencia del Hospital de Mérida.

A continuación se resume en la Figura 3.2 la distribución de las mujeres en las ciudades, pueblos y aldeas donde vivían y donde tuvo lugar gran parte del periodo de gestación, dada la influencia que estos aspectos pueden tener sobre el comportamiento alimentario, la disponibilidad de alimentos y la ingesta de nutrientes y sustancias bioactivas (Grao-Cruces y col., 2013). Como puede verse, la mayoría de las mujeres (61%) procedían de las poblaciones de Mérida, Almendralejo y Villafranca de los Barros (Figura 3.2). Un porcentaje minoritario de mujeres procedían de poblaciones fuera del ámbito de influencia del Hospital (Cáceres, Badajoz y Zafra) por diversos motivos personales.

Este Hospital se seleccionó por la buena acogida que tuvo el planteamiento del estudio por parte del personal de los Servicios de Análisis Clínicos y Obstetricia y Ginecología.



**Figura 3.2.** Distribución de las gestantes según la población de procedencia.

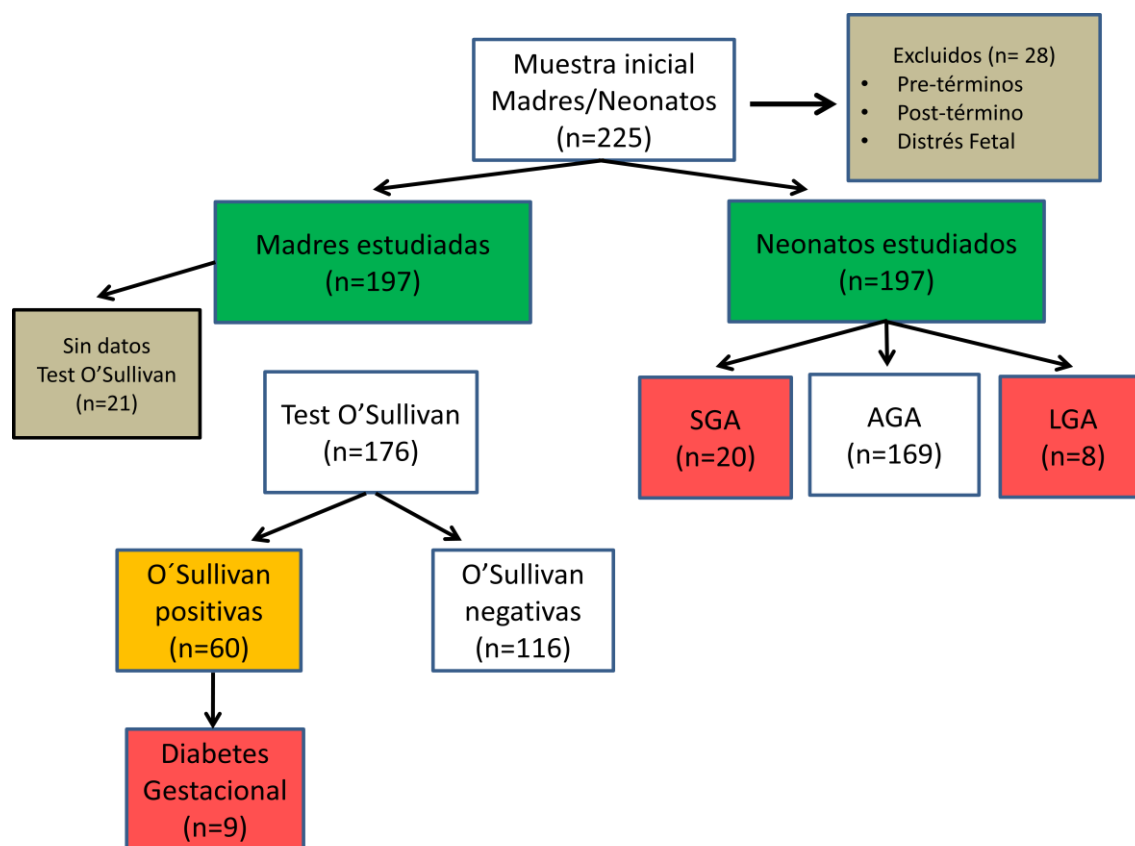
Durante la recogida de datos para utilizar en esta memoria de Tesis Doctoral, el Hospital de Mérida registraba aproximadamente 1.500 partos anuales.

#### SELECCIÓN DE LA MUESTRA

El Estudio Mérida consta de 225 muestras de sangre de cordón recogidas tras el nacimiento, 76 muestras de sangre materna para determinación de ADN y 70 encuestas nutricionales de primer trimestre, de las que sólo 35 cumplimentaron también la del periodo final del embarazo. Se tuvo acceso a algunos datos bioquímicos de 176 de las madres, a las que se había realizado la prueba de O'Sullivan (O'Sullivan y col., 1998) (Figura 3.3).

La recogida de muestras se realizó en 225 partos de gestaciones únicas que tuvieron lugar entre el 31 de mayo de 2004 y el 30 de junio de 2005, todos los días de la semana, las 24 horas del día.

Algunos datos referentes al parto (presentación, eutocia, edad gestacional, etc.), a algunas características maternas (edad, primiparidad/multiparidad, etc.) y fetales (talla, peso, índice de Apgar al minuto y a los 5 minutos, etc.) se obtuvieron del Libro de Partos del Hospital.



**Figura 3.3:** Representación esquemática de la selección de la muestra para el estudio. SGA: neonatos pequeños para su edad gestacional, AGA: neonatos apropiados para su edad gestacional, LGA: neonatos grandes para su edad gestacional.

La Tabla 3.1 resume algunas características de la población. Como puede observarse, la mayoría de las madres eran de raza caucásica, multíparas, sin DG. Los neonatos, en su mayor parte fueron a término, AGA, sin distrés fetal y nacidos en parto eutócico con presentación cefálica.

**Tabla 3.1.** Características materno-fetales de la población

Madre caucásica	99,1%
Madre primípara	39%
Diabetes gestacional	4,5%
Distrés fetal	2,3%
Presentación cefálica	98,2%
Parto eutócico	82%
Neonatos a término	95,7%
Neonatos AGA	86%

AGA: apropiados para su edad gestacional

Según los objetivos de cada publicación, se ha hecho una selección de la población siguiendo los criterios de inclusión que más se ajustaban a las necesidades de la investigación:

**PUBLICACIÓN 3: Eur J Pediatr 2009; 168:281-288:** Marcadores de resistencia a la insulina en neonatos normopeso nacidos a término. Para este trabajo se seleccionaron 115 neonatos caucásicos, de gestación única, normopeso, a término, y sin distrés fetal cuyas madres no vieron afectada su tolerancia a la glucosa durante el embarazo.

**PUBLICACIÓN 4: Eur J Pediatr 2013; 172:883-894:** Lipoproteínas, homocisteína, marcadores de resistencia/sensibilidad a la insulina en sangre de cordón y concurrencia de disglucemia y dislipemia en neonatos a término del Estudio Mérida. Se seleccionaron 197 neonatos caucásicos, de gestación única, nacidos a término, normopeso y sin distrés fetal.

**PUBLICACIÓN 5: Nutr Hosp 2011; 26:1447-1455:** Efectos de la tolerancia a la glucosa y calidad de la dieta materna durante el embarazo y de los niveles de insulina al nacimiento sobre biomarcadores de resistencia/sensibilidad a la insulina en neonatos normopeso. En este caso se seleccionaron 176 neonatos caucásicos, de gestación única, normopeso, a término, y sin distrés fetal cuyas madres fueron cribadas para disminución de la tolerancia a la glucosa durante el embarazo. En 29 madres se estudió la dieta consumida durante el tercer mes de gestación.

**PUBLICACIÓN 6: Eur J Clin Nutr 2012; 66:1008-1015:** La dieta materna con puntuaciones bajas en el IAS o ADM se asocian con niveles elevados de insulina y marcadores de resistencia a la insulina al nacimiento. Para esta publicación se seleccionaron 35 madres sin diabetes gestacional junto con sus hijos. Los niños nacidos de gestación única, nacidos a término, sin distrés fetal.

**PUBLICACIÓN 7: Eur J Nutr 2014 doi: 10.1007/s00394-014-0798-5.** Adherencia a la Dieta Mediterránea en el embarazo y concentraciones de lípidos, lipoproteínas y homocisteína al nacimiento. Se seleccionaron 35 madres sin diabetes gestacional junto con sus hijos. Los niños nacidos de gestación única, a término, sin distrés fetal.

**PUBLICACIÓN 8: Eur J Pediatr 2011; 170:1551-1558:** Efectos del polimorfismo S19W en el crecimiento, sensibilidad a insulina y lipoproteínas en neonatos normopeso. En este trabajo se seleccionaron 58 neonatos caucásicos, junto a sus madres, de gestación única, nacidos a término, normopeso, sin distrés fetal y AGA.

**PUBLICACIÓN 9: FTO. 2014. Enviado a Eur J Nutr** El polimorfismo de FTO rs993609 materno y fetal afecta a los marcadores de sensibilidad a la insulina y al perfil lipoproteico al nacimiento en niños apropiados para su edad gestacional nacidos a término. Para este trabajo se seleccionaron 53 parejas madre-niño caucásicos, de gestación única, nacidos a término, en parto eutócico con presentación cefálica, normopeso, sin distrés fetal, AGA. Hijos de madres sin diabetes gestacional. En 30 de las madres se disponía de datos nutricionales y genotipado para el gen FTO.

La parte experimental de esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado en el Hospital de Mérida, la Universidad de Valencia, y en la Universidad Complutense de Madrid, bajo la subvención de los proyectos AGL-2005-07204-C0-02-01/ALI, AGL-2008-04892-C03-02, (Proyectos ALI del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I)), CB06/03/035 y RD07/0067/0006.

## ANTROPOMETRÍA DE LOS RECIÉN NACIDOS

### PESO

Los recién nacidos, una vez secados, se colocan en un pesabebés (Soehnle 8310. Murrhardt, Alemania) con un intervalo de pesada entre 0 y 20 kg y una sensibilidad de 10 g.

### TALLA

Después de pesados, se procede a medir a los neonatos. En el servicio de Obstetricia del Hospital de Mérida se emplean dos técnicas:

Una consiste en colocar al niño decúbito supino en un longímetro, consistente en dos planos verticales, uno de los cuales hace de cabecero y el otro se desplaza sobre un tercer plano horizontal provisto de una cinta métrica. La medida se realiza por dos personas, una sujetando la cabeza con el plano de Frankfort en posición vertical y aplicando una tracción suave para que el extremo superior de la cabeza contacte con la tabla que hace de cabecero. La otra persona sujeta los pies del niño dirigiendo los dedos de los pies hacia arriba y aplicando una suave tracción y desplaza la otra tabla para que apoye en los talones del niño.

La otra técnica consiste en sujetar al neonato por los pies y cabeza abajo se talla con una cinta métrica, desde el extremo del talón hasta la coronilla, dejando caer en vertical la cinta métrica.

### ÍNDICE DE MASA CORPORAL.

Quetelet señaló en 1869 que en adultos de constitución normal, pero con estaturas diferentes, el peso era aproximadamente proporcional al cuadrado de la estatura (Garrow, 1983). El índice de Quetelet o IMC se calcula mediante la fórmula  $\text{peso (kg)}/\text{talla (m}^2\text{)}$ .

Para el intervalo normal de contenido de grasa corporal existe una correlación lineal en los individuos adultos entre la grasa corporal medida mediante densitometría y el IMC. Se cree que un IMC de 20 a 25 en sujetos sanos está asociado a una tasa de mortalidad mínima.

El IMC parece ser útil en adultos y en niños como índice de obesidad (Hernández, 1992).

La medida del peso por la altura, índice independiente de la edad, es una medida útil de la talla hasta el período prepuberal y hay estándares disponibles.

## ÍNDICE PONDERAL

En la infancia y en la vida postnatal temprana, probablemente, el índice de talla más útil es el IP, que viene definido por la fórmula:

$$IP = \frac{\text{Peso (gramos)}}{\text{Talla}^3 (\text{cm}^3)} \times 100$$

La interpretación del IP necesita ser cuidadosa cuando la cabeza de los niños es desproporcionada en tamaño, puesto que el peso de la cabeza influye mucho en el peso total (Falkner, 1985).

Según Brandt (1986), el IP sería útil para dar información sobre el estado nutricional de los niños. Todos los niños con IP <10% según las tablas de Miller y Hassasnein (1971), estarían malnutridos.

## ÍNDICE DE APGAR

Representa la vitalidad del niño y valora de forma objetiva y cuantitativa, mediante cinco criterios, el nivel de madurez de desarrollo y el buen estado fisiológico del recién nacido. Dichos criterios se resumen en la Tabla 3.2 y son: la medida de la frecuencia cardíaca, la respuesta o esfuerzo respiratorio, el tono muscular, la irritabilidad refleja (paso de catéter nasal) y el color de la piel. A cada uno de los cinco parámetros testados se le da una valoración de 0 a 2 (Tabla 3.2). La suma de todas ellas, se conoce como índice de Apgar.

**Tabla 3.2.** Componentes y puntuación del Test de Apgar

Categorías	Puntuación		
	0	1	2
Frecuencia cardíaca (latidos/min)	Paro cardíaco	Inferior a 100	Superior a 100
Respuesta respiratoria	Paro respiratorio	Llanto débil Hipoventilación	Llanto fuerte y riguroso
Tono muscular	Hipotonía intensa	Flexión parcial generalizada de las extremidades	Extremidades bien flexionadas
Irritabilidad refleja	Sin respuesta	Mueca	Tos, estornudo
Color de la piel	Cianosis generalizada Palidez	Color sonrosado Extremidades cianóticas	Completamente sonrosado

Modificado de Apgar (1953).

Este test fue introducido por Apgar (1953) hace más de 60 años y ha ganado reputación y valor diagnóstico para el asesoramiento descriptivo del estatus clínico del neonato. Una puntuación menor de 6 al primer minuto de vida implica la necesidad de maniobras de

reanimación enérgica. A los 5 minutos de vida, el test de Apgar tiene valor pronóstico, y si es inferior a 7 indica la posibilidad de secuelas neurológicas. También el índice de Apgar se utiliza como marcador de distrés fetal. Así, considerando las publicaciones de Videira Amaral y col. (1986) y las de nuestro grupo (Bastida y col., 1993; Sánchez-Muniz y col., 1994; Espárrago y col., 1999), se diagnostica ausencia de distrés fetal cuando el índice de Apgar del recién nacido presenta valores  $\geq 7$  al minuto y  $\geq 9$  a los 5 minutos.

## DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LOS NEONATOS Y LAS MADRES

### OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras el parto, se cortaba el cordón umbilical y la sangre del cordón se obtenía por punción arterial. Para las determinaciones de bioquímica y hormonas se usaron tubos BD Vacutainer SSTII con gel de separación y número de referencia 367953 (Becton Dickinson, Plymouth, UK) identificados adecuadamente para su procesamiento. Una vez en el laboratorio, los tubos se centrifugaban para obtener el suero (3.500 rpm 5 minutos). Se hicieron alícuotas, que se congelaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Para las determinaciones genéticas, en el caso de los neonatos, en la misma punción arterial del cordón se recogía la sangre en tubos BD Vacutainer EDTA con número de referencia 366454. Para las madres, se aprovechó el momento de la extracción que se les hacía al día siguiente de dar a luz para la comprobación del grupo sanguíneo, y en el mismo tipo de tubo de sangre total/EDTA se obtenía la sangre para la extracción de ADN y posterior análisis genético.

### BIOQUÍMICA

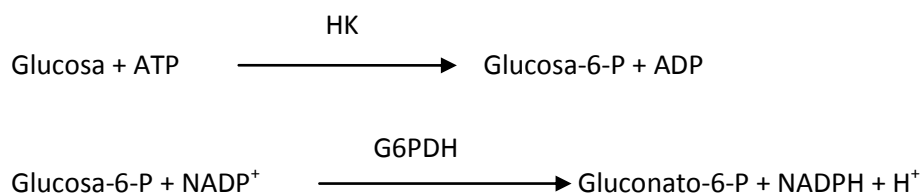
Las determinaciones analíticas que se describen a continuación fueron realizadas en un autoanalizador Roche/Hitachi Modular P (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) siguiéndose para todas ellas el mismo procedimiento de calibración y control de calidad. El autoanalizador se calibra con los estándares adecuados para cada técnica inmediatamente antes de procesar las muestras. A su vez, la calibración se controla a nivel interno con sueros control a dos niveles, fisiológico y patológico, cuyos valores debían estar comprendidos en el intervalo asignado por el fabricante para aceptar la calibración previa. Posteriormente se procedía al procesamiento de las muestras integradas en el trabajo rutinario del laboratorio.

### GLUCOSA

La concentración de glucosa en sangre de cordón se determinó usando el método enzimático de la glucosa hexoquinasa Gluco-quant® de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 11929534. El método empleado se basa en los trabajos de Schmidt (1961), y constituye un método de referencia.

**Principio del test:**

La glucosa del suero, en presencia de ATP, es fosforilada por acción de la enzima hexoquinasa (HK). Posteriormente, la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) oxida de forma específica, la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP a gluconato-6-P, no oxidándose otros hidratos de carbono. La velocidad de formación de NADPH durante la reacción es directamente proporcional a la concentración de glucosa y puede medirse fotométricamente a 340 nm.



Según el modelo de Glick (1986) el método está libre de interferencias por TG hasta 1.200 mg/dL, o por lipemia hasta un índice L de 1.000 con Intralipid®. La bilirrubina no interfiere significativamente hasta concentraciones de 60 mg/dL, mientras que la hemoglobina (Hb) hasta 1.000 mg/dL.

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración “Calibrator for automated system” de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), Nº de referencia 10759350. El control de calidad interno se llevó a cabo con “Precinorm U”, Nº de referencia 10171743 y “Percipath U”, Nº de referencia 10171778 ambos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

**COLESTEROL TOTAL**

La concentración de colesterol total en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método enzimático colorimétrico CHOD-PAP (CHOL) de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 11875540.

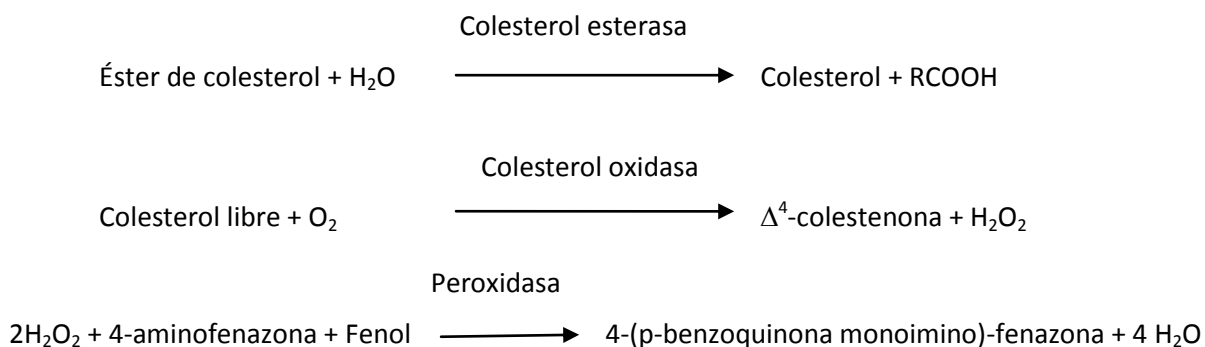
Dicho método se basa en el primer método completamente enzimático que describieron Roeschlau y col., (1974) y Allain y col., (1974) basado en la determinación de la concentración de  $\Delta^4$ -colesteno y formación de color por la reacción de Trinder (1969).

**Principio del test:**

Tras el desdoblamiento enzimático del colesterol esterificado (CE) por la enzima colesterol esterasa, el colesterol libre formado, en presencia de oxígeno molecular, se transforma por acción de la enzima colesterol oxidasa en colesteno y peróxido de hidrógeno. Posteriormente, el peróxido de hidrógeno formado en presencia de fenol y aminofenazona (reacción de Trinder) origina un compuesto coloreado. La intensidad del color originada es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra y puede medirse fotométricamente a 500 nm.



La optimización del desdoblamiento de los CE, permite la estandarización con patrones primarios y secundarios y una comparación directa con los métodos de referencia del CDC y el NIST, siendo posible su automatización. Según el modelo de Glick (1986) el método no presenta interferencias por bilirrubina hasta concentraciones de 25 mg/dL para bilirrubina conjugada y 10 mg/dL para bilirrubina no conjugada; por hemoglobina (Hb) hasta 700 mg/dL, y por lipemia hasta un índice L de 1.250 con Intralipid®, sin que haya correlación satisfactoria entre el índice L que indica turbidez y la concentración de TG.



La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración “Calibrator for automated system” de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), Nº de referencia 10759350. El control de calidad interno se llevó a cabo con “Precinorm U”, Nº de referencia 10651257 y “Percipath U”, Nº de referencia 10651265 ambos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### COLESTEROL TRANSPORTADO POR LA FRACCIÓN HDL

La concentración de colesterol en la fracción HDL (HDLc) se determinó mediante el método enzimático homogéneo HDLc sin pretratamiento (HDL plus 2nd generation) de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 03038556 y 03038572.

El método empleado se basa en el que desarrollaron Sugiuchi y col. (1995), que determina directamente el contenido de HDLc empleando enzimas modificadas con polietilenglicol (PEG) y sulfato de dextrano.

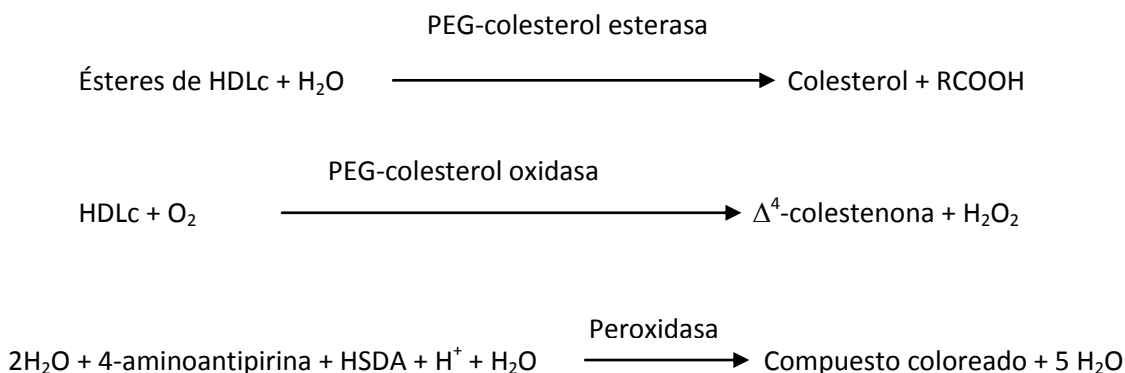
#### Principio del test

Las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa modificadas con PEG presentan actividades catalíticas selectivas frente a las fracciones de lipoproteínas, aumentándose la reactividad en el orden siguiente: LDL < VLDL = QM < HDL. El método se basa en la determinación de color originado, proporcional a la concentración de  $\Delta^4$ -colestonona formada a partir del colesterol presente en la fracción HDL.

En presencia de  $\text{MgSO}_4$ , el sulfato de dextrano forma complejos solubles en agua con LDL, VLDL y QM y resistentes a la acción de las enzimas modificadas con PEG.

El compuesto coloreado se mide fotométricamente a 600 nm.

Este método alcanza los objetivos del NIH y del NCEP respecto a su aceptable rendimiento (Kimberly y col., 1999). Los resultados de este método coinciden con los de los métodos de precipitación y análisis por ultracentrifugación.



HSDA: Sodio N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina

Según el modelo de Glick (1986) el método se ve libre de interferencias por lipemia hasta concentraciones de TG de 1.200 mg/dL, o un índice L de 1.000 con Intralipid®. La bilirrubina no interfiere significativamente hasta concentraciones de 30mg/dL en su forma conjugada y hasta 70 mg/dL en su forma no conjugada, y la Hb hasta concentraciones de 1.200 mg/dL.

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración “Calibrator for automated system” Lipids de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), con número de referencia 12172623. El control de calidad interno se llevó a cabo con “Precinorm L”, con número de referencia 11240161 y “Percipath HDL/LDL-C”, con número de referencia 03004244, ambos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### COLESTEROL TRANSPORTADO POR LAS FRACCIONES LDL Y VLDL

La medida de VLDLc se obtiene al dividir por 5 la concentración de TG en suero.

Las estimaciones de LDLc y VLDLc se realizaron aplicando la fórmula de Friedewald y col. (1972) donde:

$$\text{LDLc} = \text{CT} - (\text{TG}/5 + \text{HDLc})$$

Esta fórmula tiene buena correlación con las medidas de LDLc obtenidas por ultracentrifugación y fue validada por Glueck y col. (1973) para la determinación de LDLc en sangre de cordón.

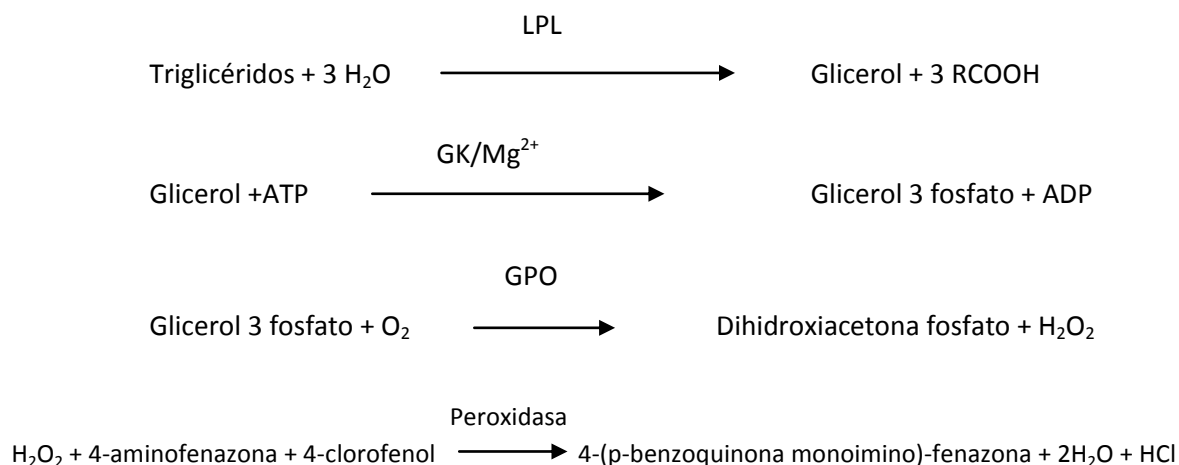
## TRIGLICÉRIDOS

La concentración de TG en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método enzimático colorimétrico GPO-PAP (TG) de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 11876023.

Este método se basa en el trabajo de Wahlefeld (1974), que emplea una LPL de origen microbiano para hidrolizar completa y rápidamente los TG a glicerol.

Principio del test:

Tras la hidrólisis de los TG a glicerol por la LPL microbiana, éste es transformado por acción de la enzima glicerol quinasa (GK) en glicerol fosfato, el cual en presencia de oxígeno molecular y glicerol-fosfato-oxidasa (GPO) origina dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona por la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y 4-clorofenol para formar un compuesto coloreado en una reacción de Trinder a punto final (Trinder, 1969). La coloración formada se mide fotométricamente a 500 nm.



El método está libre de interferencias por bilirrubina conjugada hasta concentraciones de 10 mg/dL, de 27 mg/dL para bilirrubina no conjugada y 500 mg/dL en el caso de la Hb según el modelo de Glick (1986).

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración “Calibrator for automated system” de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), con número de referencia 10759350. El control de calidad interno se llevó a cabo con “Precinorm U”, con número de referencia 10651257 y “Percipath U”, con número de referencia 10651265 ambos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### APOLIPOPROTEÍNA A1

La concentración de Apo A1 se determinó por el método inmunoturbidimétrico Tina-quant® (APO A-I ver.2) de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 03032612.

El método empleado se basa en los descritos por Rifai (1986) y Siedel (1988). Los anticuerpos anti-apolipoproteína A1 reaccionan con el antígeno de la muestra formando complejos antígeno-anticuerpo que se miden turbidimétricamente.

Según el modelo de Glick (1986), el método está libre de interferencias por bilirrubina conjugada y no conjugada hasta concentraciones de 60 mg/dL. Tampoco hay interferencias significativas para Hb hasta concentraciones de 1.000 mg/dL ni para lipemia hasta un índice L de 1.000 con Intralipid®.

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración "Calibrator for automated system" Lipids de Roche, con número de referencia 12172623. El control de calidad interno se llevó a cabo con "Precinorm L", con número de referencia 11240161 y "Percipath L", con número de referencia 11291114, ambos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### APOLIPOPROTEÍNA B

La concentración de Apo B en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método inmunoturbidimétrico Tina-quant® (APO B ver.2) de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 03032639.

El método empleado se basa en los descritos por Rifai (1986) y Siedel (1988). Los anticuerpos anti-apolipoproteína B reaccionan con el antígeno de la muestra formando complejos antígeno-anticuerpo que se miden turbidimétricamente después de la aglutinación.

Según el modelo de Glick (1986), el método está libre de interferencias por bilirrubina conjugada y no conjugada hasta concentraciones de 60 mg/dL. En el caso de la Hb no hay interferencias significativas hasta concentraciones de 1.000 mg/dL, y la lipemia no interfiere hasta un índice L de 1.000 con Intralipid®.

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración "Calibrator for automated system" Lipids de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza), con número de referencia 12172623. El control de calidad interno se llevó a cabo con "Precinorm L", con número de referencia 11240161 y "Percipath L", con número de referencia 11291114 ambos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### LIPOPROTEÍNA (a)

La concentración de Lp(a) en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método inmunoturbidimétrico Tina-quant® (Lipoprotein (a)) de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 11660390.

La determinación se basa en el método de Siekmeier y col. (1996). Los anticuerpos anti-lipoproteína (a) reaccionan con el antígeno de la muestra formando complejos antígeno-anticuerpo que se miden turbidimétricamente tras la aglutinación.

El método está libre de interferencias por bilirrubina conjugada y no conjugada hasta concentraciones de 60 mg/dL, por Hb hasta concentraciones de 500 mg/dL, y por lipemia hasta una concentración aproximada de TG de 1.000 mg/dL según el modelo de Glick (1986).

La cuantificación de las muestras se realizó frente a un calibrador interno formado por Lp(a) altamente purificada suministrado con los reactivos. El control de calidad interno se llevó a cabo con "Lp(a) Control Set", con número de referencia 11660993 de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

##### COCIENTES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Por la importancia que tienen como indicadores de ECV, se calcularon diferentes cocientes a partir de los parámetros lipídicos, lipoproteicos y apolipoproteicos obtenidos.

Además de los estudios que indican que los niveles plasmáticos de LDLc y HDLc son importantes factores de RCV (Castelli y col., 1986; Gordon y col., 1989), existen otros que también consideran los cocientes CT/HDLc, HDLc/Apo A1, Apo A1/Apo B, HDLc/LDLc como indicadores de RCV (Stampfer y col., 1991; Assmann y Schulte, 1992; Walldius y col., 2004). Las relaciones LDLc/Apo B, TG/HDLc, han sido utilizadas como marcadores de tamaño, metabolización y aterogenicidad de las LDL (Sánchez-Muniz y col., 1997; Cuesta y col., 1998; Boizel R y col., 2000; Tani y col., 2011), mientras que el cociente HDLc/Apo A1 resulta marcador de tamaño y metabolización de las HDL (Bastida y col., 1998).

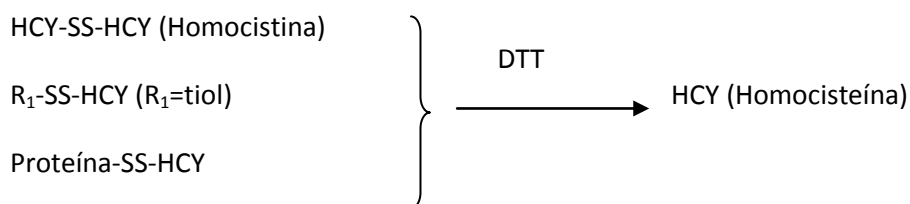
##### HOMOCISTEÍNA

La concentración de tHcys en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método inmunológico de polarización de fluorescencia (FPIA) Homocysteine de Abbott Diagnostics (Abbot Park, Illinois, USA) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 7D29 para el análisis automatizado en un autoanalizador IMX® System de Abbott Diagnostics (Abbot Park, Illinois, USA).

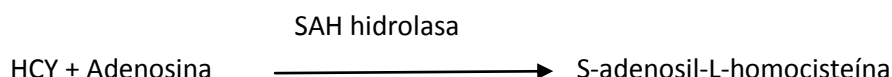
La determinación se basa en el trabajo de Shipchandler y Moore (1995). La homocisteína unida en forma oxidada se reduce a homocisteína libre y ésta se convierte enzimáticamente en S-adenosil-L-homocisteína (SAH).

Principio del test:

Reducción: La homocistina y las formas de homocisteína presentes en la muestra en forma de disulfuro mixto y unidas a proteínas se reducen utilizando el ditiotreitól (DTT) y dan lugar a homocisteína libre.



Conversión enzimática: La homocisteína total libre se convierte en S-adenosil-L-homocisteína (SAH) utilizando, en presencia de exceso de adenosina, la enzima SAH hidrolasa.



El método está libre de interferencias por bilirrubina hasta concentraciones de 20 mg/dL. En el caso de la Hb no hay interferencias significativas hasta concentraciones de 1000 mg/dL, y la lipemia no interfiere hasta una concentración de TG de 1000 mg/dL según el modelo de Glick (1986).

El autoanalizador se calibra con los estándares “Homocysteine calibrator” de Abbott Diagnostics (Abbot Park, Illinois, USA) con número de referencia 9F84-01. A su vez, la calibración se controla a nivel interno con sueros control a dos niveles, fisiológico y patológico, con “Homocysteine controls”, con número de referencia 9F84-10, también de Abbott Diagnostics (Abbot Park, Illinois, USA) cuyos valores debían estar comprendidos en el intervalo asignado por el fabricante para aceptar la calibración previa. Posteriormente se procedía al procesamiento de las muestras integradas en el trabajo rutinario del laboratorio.

#### DETERMINACIÓN DE HORMONAS

Las determinaciones analíticas que se describen a continuación fueron realizadas en un sistema Immulite 1000 (Diagnostic Products Corporation, Flanders, Nueva Jersey). Para todas ellas se siguió el mismo procedimiento de calibración y control de calidad. El autoanalizador se calibra con los estándares adecuados para cada técnica inmediatamente antes de procesar las muestras. A su vez, la calibración se controla a nivel interno con sueros control a dos niveles, fisiológico y patológico, cuyos valores debían estar comprendidos en el intervalo asignado por el fabricante para aceptar la calibración previa. Posteriormente se procedía al procesamiento de las muestras integradas en el trabajo rutinario del laboratorio.

#### HORMONA DEL CRECIMIENTO

La concentración de GH en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método inmunológico quimioluminiscencia GH de Diagnostic Products Corporation (Flanders, Nueva Jersey) utilizando el equipo de reactivos con referencia LKGH1.

La cuantificación de las muestras se realizó frente al ajustador “LGHL y LGHH”, mientras que el control de calidad interno se llevó a cabo con “CON6”, ambos incluidos en el equipo de reactivo.

#### IGF-1

La concentración de IGF-1 en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método inmunológico quimioluminiscencia IGF-I de Diagnostic Products Corporation (Flanders, Nueva Jersey) utilizando el equipo de reactivos con referencia LKGF1.

La cuantificación de las muestras se efectuó frente al ajustador “LGFL y LGFH” mientras que el control de calidad interno se realizó con “LGCOCM”, ambos incluidos en el equipo de reactivo.

Las determinaciones analíticas que se describen a continuación fueron realizadas en un autoanalizador Roche/Hitachi Modular E170 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) siguiéndose para todas ellas el mismo procedimiento de calibración y control de calidad. El autoanalizador se calibra con los estándares adecuados para cada técnica inmediatamente antes de procesar las muestras. A su vez, la calibración se controla a nivel interno con sueros control a dos niveles, fisiológico y patológico, cuyos valores debían estar comprendidos en el intervalo asignado por el fabricante para aceptar la calibración previa. Posteriormente se procedía al procesamiento de las muestras integradas en el trabajo rutinario del laboratorio.

#### CORTISOL

La concentración de cortisol en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método inmunológico de electroquimioluminiscencia (ECLIA) Cortisol de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 11875116.

El método empleado consiste en una reacción competitiva, en la que la muestra se incuba con un anticuerpo biotinilado específico anti-cortisol y un derivado de cortisol marcado con quelato de rutenio, el [Quelato Tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II)] (Rubpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>. Los puntos de fijación del anticuerpo marcado son ocupados, según sea la concentración de cortisol en la muestra, en parte por el analito de la muestra y en parte por el hapteno marcado con rutenio, provocando la formación del inmunocomplejo respectivo. Tras incorporar micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción se traslada a la celda de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

Según el modelo de Glick (1986), el método está libre de interferencias por bilirrubina hasta concentraciones de 60 mg/dL, por Hb hasta concentraciones de 1,9 g/dL y por lipemia hasta una concentración de Intralipid® de 2.700 mg/dL. En el caso de la biotina no se observan interferencias hasta concentraciones de 30 ng/mL, y los factores reumatoides no interfieren hasta concentraciones de 1.100 UI/mL. Según el fabricante, las principales moléculas esteroideas tienen una reactividad cruzada muy leve con el cortisol (por ejemplo 0,3% con la cortisona).

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración “Elecsys Cortisol Cal Set” de Roche, con número de referencia 11875124. El control de calidad interno se llevó a cabo con “PreciControl Universal” 1 y 2, con número de referencia 11731416 también de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### INSULINA

La concentración de insulina en los sueros procedentes de sangre de cordón se determinó por el método ECLIA Insulin de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza) utilizando el equipo de reactivos con número de referencia 12017547.

El método empleado consiste en una reacción tipo sándwich en la que la muestra se incuba con un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-insulina y un anticuerpo monoclonal específico anti-insulina marcado con quelato de rutenio, el [Quelato Tris (2-2'-bipiridina) rutenio (II)] (Rubby)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, formándose el complejo sándwich. Tras incorporar micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción se traslada a la celda de lectura donde por magnetismo las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

Según el modelo de Glick (1986) el método está libre de interferencias por bilirrubina hasta concentraciones de 90 mg/dL y por lipemia hasta una concentración de Intralipid® de 1.800 mg/dL. La hemólisis interfiere en la determinación, ya que los eritrocitos lisados liberan peptidasas que degradan la insulina. La biotina no interfiere hasta concentraciones de 60 ng/mL, y los factores reumatoides hasta 18.900 UI/mL.

La cuantificación de las muestras se realizó frente al suero de calibración “Elecsys Insulin Cal Set”, con número de referencia 12017504. El control de calidad interno se llevó a cabo con “PreciControl Universal” 1 y 2, con número de referencia 11731416. Todos ellos de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza).

#### MARCADORES DE SENSIBILIDAD/RESISTENCIA A LA INSULINA:

En la actualidad, dada la dificultad de utilización de ciertas técnicas que obligan a la determinación frecuente de insulina y glucosa, como la prueba del *Clamp* hiperinsulinémico-euglicémico (Pérez Maraver y Montanya Mias, 2001) para la valoración de la



sensibilidad/resistencia a la insulina se utilizan, cada día más, ciertas fórmulas que previamente han sido validadas frente a otras consideradas “gold estándar” (Strackowski y col., 2004). Así, como marcador de resistencia a la insulina se empleó el índice HOMA (Matthews y col., 1985). Los valores del HOMA-IR fueron calculados según Livesey (2006) como:

$$\text{Glucosa (mmol/L)} \times \text{Insulina (mIU/L)} / 22,5.$$

También se emplearon los índices HOMA-IS (Livesey, 2006), y QUICKI (Katz y cols., 2000) como marcadores de sensibilidad a la insulina. El HOMA-IS evalúa la sensibilidad a la insulina en condiciones de no estimulación mediante la fórmula:

$$\text{HOMA-IS} = 1/\text{HOMA-IR},$$

mientras que los valores de QUICKI fueron calculados según la fórmula:

$$1/[(\log \text{Insulina})(\text{mIU} / \text{L}) + (\log \text{Glucosa}) \text{ mg/dL}]$$

Otros parámetros que informan sobre la integridad insulino-secretora del páncreas y la sensibilidad celular a la insulina son el HOMA-B y HOMA-D, respectivamente (Livesey, 2006).

El HOMA-B evalúa la capacidad de producir insulina por las células  $\beta$  del páncreas en condiciones de no estimulación. Para ello se empleó la fórmula:

$$\text{HOMA-B} = 20 \times \text{Insulina (mIU/L)} / \text{Glucosa (mmol/L)} - 3,5.$$

Por último el HOMA-D se empleó para evaluar la relación entre glucosa basal e insulina basal mediante la fórmula:

$$\text{HOMA-D} = \text{HOMA-IS} \times \text{HOMA-B}$$

En esta memoria de Tesis Doctoral también se han utilizado como marcadores de sensibilidad o resistencia a la insulina y del metabolismo hidrocarbonado el cociente insulina/cortisol (Bowie, 1964; Torún y Chew, 1994; Bleicher y col., 2002) y la relación glucosa/insulina.

#### CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la comparabilidad de los resultados se realizó un control de calidad externo a través de BIO-RAD LABORATORIES (External Quality Assurance Services) (Alcobendas, España). Asimismo, el laboratorio del Hospital de Mérida sigue las normas del Programa de Garantía de la Calidad para los Laboratorios Clínicos de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC).

Los coeficientes de variación intra-ensayo e interensayo fueron respectivamente 1% y 1,7% para glucosa; 1,5% y 4,9% para insulina; 1,7% y 2,8% para cortisol; 5% y 5,8% para GH; 4,3% y 6,6% para IGF-1; 0,8% y 1,7% para CT; 1,5% y 1,8% para TG; 0,9% y 1,85% para HDLc;

1% y 2,4% para Apo A1; 1,5% y 2,5% para Apo B; 2,3% y 2,8% para tHcys; 8% y 8,9% para AE; y 4,5% y 5,0% para LDLox.

#### OTRAS DETERMINACIONES

Las siguientes determinaciones se llevaron a cabo en el laboratorio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

#### ARILESTERASA

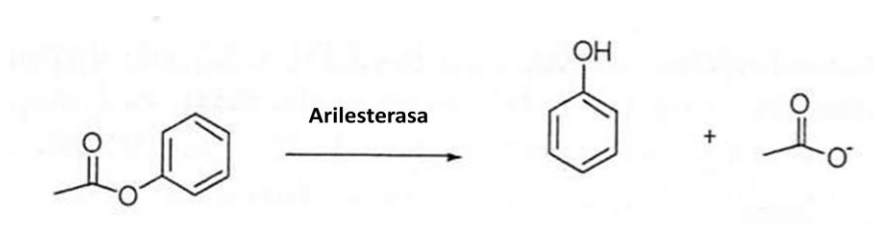
La actividad arilesterasa (AE) (EC 3.1.1.2), una de las actividades enzimáticas de la enzima PON 1, se determinó siguiendo el método de Nus y col. (2006). Esta técnica emplea como tampón una mezcla de electrolitos, conocida como SBF (*simulated body fluid*), que reproduce la composición del medio interno en el que trabaja la AE. El SBF introducido por Kokubo y col. (1990) tiene una concentración iónica bastante similar a la del suero humano, aunque contiene 6 veces menos bicarbonato y 1,8 veces más cloruro que el suero humano (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Comparación entre la composición del suero humano y la del SBF.

	Suero humano	SBF
Na	142	142
K	5	5
Ca	2,5	2,5
Mg	1,5	1,5
Cl	103	147,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1	1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5
Tampón	-----	Tris
pH	7,4	7,4

Adaptado de Kokubo y col. (1990).

El fundamento de la técnica se basa en cuantificar la hidrólisis del acetato de fenilo a fenol, biocatalizado por la enzima AE, midiendo el incremento de absorbancia que tiene lugar.



Las determinaciones se hicieron en un espectrofotómetro termostatzado T80+ (PG Instruments Ltd. Wibtoft, Leics, Reino Unido) a la longitud de onda de máxima absorción del producto de reacción (270nm) frente a tampón SBF a pH =7,34-7,4 y 37°C, en cubetas de cuarzo con un volumen final de 2 mL. Una unidad de actividad AE se define como aquella capaz de originar 1 mol de acetato de fenilo hidrolizado por litro y por minuto.

Dado que la enzima AE no se encuentra aislada de forma comercial, para el control de calidad de las determinaciones se empleó suero obtenido a partir de un liofilizado de una mezcla de sueros procedentes de humanos sanos reconstituido con agua bidestilada 1/40 (v/v). En esta muestra control previamente se había determinado la actividad AE y se conocía el intervalo de seguridad para aceptar como correcta la determinación, (Nus y col., 2006). Junto a las muestras problema se analizaron duplicados del suero control, no dando por válidos los valores determinados en una tanda de trabajo cuando el valor medio de la actividad AE en el duplicado no se ajustaba al valor medio  $\pm 2SD$  previamente establecido.

#### LDL OXIDADAS

La determinación de la concentración sérica de LDLox se realizó siguiendo el método ELISA tipo sándwich Mercodia Oxidized LDL ELISA, con número de referencia 10-1143-01 (Mercodia, Uppsala, Suecia). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro ELx808BioTek (Bio Tek Instruments, Winoosky, Vermont, USA)

El método se basa en los trabajos de Holvoet y col. (1996), que empleaba un anticuerpo monoclonal de origen murino para los ensayos de ELISA en la determinación de LDLox. El fundamento del test está basado en la unión de dos anticuerpos monoclonales a los determinantes antigénicos de la Apo B oxidada. Durante la incubación las LDLox de la muestra reaccionan con los anticuerpos anti-LDLox unidos a las paredes de los pocillos. Tras el lavado que elimina los componentes sanguíneos que no se han unido a la placa, se añade un conjugado de peroxidasa anti-anticuerpos contra Apo B que reconoce las LDLox unidas a la placa. Tras otro periodo de incubación y lavado para eliminar el conjugado libre, se detecta el conjugado unido a las LDLox por una reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. La reacción se detiene añadiendo ácido sulfúrico 0,5 M al medio, que frena el cambio de color. El color del producto de la reacción se mide a 450nm.

Para la calibración y control de calidad se utilizaron los sueros control y patrones del laboratorio Mercodia (Uppsala, Suecia) incluidos en el kit.

#### DETERMINACIONES GENÉTICAS

La extracción del ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Mérida con el kit de extracción Versagene™ DNA blood Kit de Gentra Systems (Minneapolis, MN, USA), número de catálogo VGD-0050B1. El análisis genético de polimorfismos se realizó en el Laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Una vez extraído el ADN se comprobaba su presencia en gel de agarosa calidad MS al 1% con bromuro de etidio 1  $\mu\text{g/mL}$  para poder visualizar el ADN con luz ultravioleta (UV). Cada muestra de ADN se cargaba en un pocillo con azul de bromofenol (0,25% azul de bromofenol y 30% glicerol) que además de facilitar la carga de los pocillos, permitía visualizar el frente electroforético del gel. Como patrón de pesos moleculares se empleaba el Marcador comercial XIV de Roche Applied Science (Indianápolis, Indiana, USA) número de catálogo 11721933001

250 µg/mL a una concentración de 80 ng/mL en buffer TAE 1x. Los geles de agarosa se dejaban correr a 100 voltios durante 30 minutos.

Para la captura y gestión de imágenes de los geles se empleó el sistema de fotodocumentación de geles por captura de imágenes Gelprinter Plus TDI (Madrid, España), el sistema de procesamiento de imágenes 1-D Manager para Windows 95/98/NT TDI (Madrid, España) referencia 00-1DMAN y un Transiluminador UV 302 nm TDI (Madrid, España) referencia 13100100 X.

En los casos que la cantidad de ADN obtenido no fue suficiente, se procedió a una nueva extracción.

#### INTEGRIDAD Y PUREZA DEL ADN

Para la medición de la pureza del ADN se realizaron lecturas de absorbancia de todas las muestras a 260 nm ( $\lambda$  de máxima absorción de ARN y ADN) y a 280 nm ( $\lambda$  de máxima absorción de proteínas y fenol). Una muestra de ADN pura presenta una relación de absorbancia 260nm/280nm comprendida entre 1,8 y 2,0. Si existe contaminación con proteínas o fenol, la relación será menor (Wicks RJ, 1986).

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia (visible/UV) con lámpara de D2 modelo Graphicord UV-240 Shimadzu (Kioto, Japón) con impresora (mod. Graphicprint PK-1).

#### DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS

##### GEN APOA5

El ADN se genotipó para el SNP 56C>G del gen de la Apo A5 mediante un análisis de la curva de desnaturalización (*melting*) con un LightTyper™ (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Para el análisis de la curva de desnaturalización (*melting*), se amplificó un fragmento de 136 pares de bases conteniendo el SNP 56C>G con los cebadores:

5'-AGAGCCCAGGCCCTGATTA-3'

5'-CATCTTCTGCTGATGGATCTGCT-3' (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania)

junto con la sonda SimpleProbe Flq-TCTCCACAGCGTTTTCGGCC-p (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania), donde Flq representa un desactivador (*quencher*) fluorescente. Se realizó una PCR en una placa de 384 pocillos con un volumen total de 10 µL por pocillo en un termociclador Mastercycler-ep380® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La mezcla de reacción usada en la PCR consistió en 40 ng de ADN genómico, 0,2 µL de cada cebador (10 µM), 1 µL de la sonda SimpleProbe (1,6 µM), 5 U de Taq polimerasa de inicio rápido (Fast Start Taq Polymerase) (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 µM y 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Tras una desnaturalización inicial a 94°C, se realizaron 34 ciclos de PCR con 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de alineamiento e hibridación del cebador (*annealing*) a 55°C y 45 segundos de extensión a 72°C;

Se hacía una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se realizaba un ciclo de desnaturalización (*melting*) final en el LightTyper™ calentando las muestras a 85°C y enfriándolas a 40°C con una tasa de rampa de 0,2°C/segundo, con una lectura continua de fluorescencia (Francés y col, 2005).

#### GEN FTO

El polimorfismo rs9939609 del gen FTO se determinó con un secuenciador 7900HT (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA) y un ensayo de discriminación alélica TaqMan® por fluorescencia estándar. Para realizar el control de calidad interno, se hizo doble genotipado del 10% de las muestras escogidas de forma aleatoria, no hallándose discrepancias en los resultados. La tasa de genotipado (*calling rate*) fue del 95%. La frecuencia de genotipos no se desvió de la esperada según el equilibrio de Hardy-Weinberg para este polimorfismo ( $P > 0,1$ ).

#### *PCR a tiempo real. Sondas TaqMan™.*

La determinación de polimorfismos se realizó mediante una reacción tipo PCR a tiempo real (RT-PCR) usando sondas TaqMan™ fluorescentes específicas para cada alelo del SNP, que discriminan genotipos gracias a la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, y a las señales fluorescentes que se generan. La sonda TaqMan™ es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos, y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* (FAM™ ó VIC™) y otro unido en el extremo 3' desactivador de fluorescencia ó *quencher* (NFQ). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. Si la secuencia de DNA complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador, degrada la sonda gracias a su actividad 5'-endonucleasa.

Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia, que es recogido y almacenado por un detector. La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del cebador continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia, que será proporcional a la cantidad de producto generado. Cada sonda se une de forma específica a su secuencia complementaria, momento en el que la polimerasa separa el *reporter* del *quencher* y la fluorescencia que se emite será específica de la secuencia a la que era complementaria.

Todas las amplificaciones se efectuaron en un volumen total de 5 µL por muestra. La mezcla de reacción está compuesta por:

1,875 µL de agua bidestilada

2,5 µL de TaqMan® Genotyping Master Mix

0,125 µL de *TaqMan*® *SNP Genotyping Assay* con la sonda VIC/FAM:

GGTTCCTTGCGACTGCTGTGAATTT[A/T]GTGATGCACTGGATAGTCTCTGTT

0,5 µL de ADN a una concentración de 10 ng/µL.

Las reacciones se realizaron en placas de 384 pocillos (Microamp® Optical 384-well Reaction Plate, Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA). Una vez cargada la placa se cubrió con un adhesivo y se colocó en el bloque térmico del sistema de detección 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, California, USA). Se realiza la programación de la amplificación con el programa SDS 2.3. Las condiciones de la RT-PCR según el protocolo estándar fueron:

- 1) Desnaturalización inicial: 10 minutos a 95°C
- 2) 40 ciclos de desnaturalización 15 segundos a 92°C, y 1 minuto a 60°C de hibridación/extensión.

Una vez finalizada la amplificación, se determina el genotipo mediante discriminación alélica. El programa SDS 2.3 clasifica las muestras según la fluorescencia detectada, como se muestra a continuación:

Homocigoto salvaje (*wild type*) (Alelo A). Si sólo presenta la fluorescencia VIC.

Homocigoto mutado (Alelo G) Si sólo presenta la fluorescencia FAM.

Heterocigoto (Alelo A y G) si muestra ambas fluorescencias (VIC y FAM).

Una vez obtenidos estos datos de fluorescencia, debemos determinar a qué alelos de los polimorfismos estudiados les corresponde estos términos (PUBMED). Seguidamente se calcula el equilibrio de Hardy-Weinberg en el paquete informático de análisis de ligamiento LINKUTIL (Ott, 2004), y se calculan las frecuencias genotípicas.

## ENCUESTA NUTRICIONAL

Las encuestas nutricionales se realizaron en el domicilio de las voluntarias, y su duración fue aproximadamente entre 60 y 90 minutos. Se recabaron datos sobre la ingesta de alimentos, hábitos de consumo, forma de preparación y lugar habitual de preparación y consumo de los mismos. Los objetivos de las encuestas fueron: a) evaluar la dieta materna en el primer trimestre del embarazo y considerar la posible influencia que ésta pudiera tener en los parámetros bioquímicos y hormonales de los recién nacidos y b) valorar el consumo de alimentos y los posibles cambios que pudiera haber habido al final del embarazo.

En la primera parte de la encuesta se hacía un recuerdo de consumo de alimentos en las últimas 72 horas. Es un método cuya finalidad es determinar el consumo calórico y de macronutrientes aproximado de los sujetos de estudio. Se pidió a las madres que recordaran

todos los alimentos y bebidas ingeridos en las últimas 72 horas. Las cantidades de alimentos estaban expresadas en medidas caseras. Una vez conocido el consumo de alimentos y bebidas, se transformaron en energía y nutrientes utilizando las tablas de composición de alimentos para población española (Mataix Verdú, 2003; Ortega y col., 2004), que permite calcular la ingesta de: energía (kcal), proteínas, hidratos de carbono, lípidos totales, fibra, minerales (calcio, yodo, magnesio, zinc, sodio, potasio, fósforo, selenio), vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, D, E, A y equivalentes de retinol, equivalentes de Niacina, folatos y carotenos), colesterol, AGS, AGM, AGP, ácidos grasos *cis* y *trans*, y alcohol.

Tras realizar las aclaraciones oportunas, se cumplimentaba una encuesta de frecuencia de consumo de alimentos y bebidas, donde se procedía a registrar el número de veces que un alimento era consumido al día, a la semana o al mes, siguiendo un protocolo estandarizado del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en el que se hicieron algunas adaptaciones en el tipo de alimentos considerando la población a la que iba dirigida.

La encuesta de frecuencia de consumo incluía los 169 ítems clasificados según grupos de alimentos y estaba basada en una encuesta de frecuencia de consumos empleada en el estudio enKid (Serra-Majem y Aranceta Bartrina, 2002). Los alimentos consumidos fueron agrupados en cereales, lácteos, huevos, azúcares, aceites y grasas, verduras y hortalizas, legumbres, frutas, carnes y derivados, pescados, moluscos y crustáceos, bebidas y varios. Para facilitar las respuestas, se distribuyeron los alimentos según las comidas que se hacen en el día (desayuno, media mañana, comida, merienda, cena y post-cena). Además, se contaba con la ayuda de un manual de platos y raciones con soporte fotográfico (Mataix Verdú y col., 1993). Para validar el aporte y el gasto energético al finalizar la encuesta nutricional se hizo un cuestionario de actividad física (Carbajal Azcona y Sánchez-Muniz, 2003).

A continuación, los datos de los alimentos de las encuestas fueron transformados en energía y nutrientes mediante el empleo de las Tablas de Composición de Alimentos recogida en el programa de evaluación nutricional DIAL<sup>®</sup> (Alce Ingeniería, Madrid) (Ortega y col., 2004). La determinación de la Ingestas Diarias Recomendadas (IDR) se hizo utilizando las Tablas de IDR de Energía y Nutrientes para la Población Española (Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, 2008) teniendo en cuenta la condición de gestantes de las encuestadas. Como ingesta energética recomendada se considera la que permite cubrir el gasto calórico de acuerdo con el criterio de la OMS (OMS, 1985) y contempladas por el Departamento de Nutrición (Moreiras-Varela y col., 2008). La comparación de la ingesta real con la recomendada permitió enjuiciar si la dieta cubría las ingestas recomendadas para los diferentes nutrientes analizados. También el programa permite para cada individuo conocer el perfil calórico, el perfil graso y otros parámetros de calidad de la dieta, como el IAS (Kennedy y col., 1995, adaptado por Ortega y col., 2004).

Aunque el programa DIAL calcula la contribución de muchos componentes de la dieta, los nutrientes tenidos en cuenta para esta memoria de Tesis Doctoral fueron: energía, agua,

alcohol, proteínas, hidratos de carbono, azúcares sencillos, fibra vegetal, lípidos totales, AGS, AGM, AGP, colesterol, vitaminas del grupo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacina, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>), ácido fólico, vitamina C, vitamina A, retinol, carotenos, vitamina D, vitamina E, vitamina K, ácido pantoténico, biotina, calcio, hierro, yodo, magnesio, zinc, sodio, potasio, fósforo, selenio, cobre, cromo, níquel, cloro, flúor, manganeso, AG C14:0, C16:0, C18:0, C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C20:5, C22:5, C22:6, AGP  $\omega$ -3, AGP  $\omega$ -6. También se han empleado los siguientes parámetros: energía de proteínas (% kcal), energía de lípidos (% kcal), energía de hidratos de carbono (% kcal), energía de alcohol (% kcal), energía de AGS (% kcal), energía de AGM (% kcal), energía de AGP (% kcal), cocientes AGP/AGS, AGP+AGM/AGS, AGP  $\omega$ -6/AGP  $\omega$ -3, calidad de la proteína, calidad del hierro (% hemo), relación calcio/fósforo, relación vitamina E (mg)/AGP (g), relación vitamina B<sub>6</sub> (mg)/proteína (g). Para la valoración de la calidad de la dieta, como se comentará más adelante, se utilizó una función del programa DIAL para calcular el IAS, que tiene en cuenta el consumo de: cereales y legumbres, verduras y hortalizas, frutas, lácteos, carnes, pescados y huevos, energía de lípidos (% kcal), energía AGS (% kcal), colesterol (mg), sodio aportado por los alimentos (mg), y variedad de la dieta.

El IAS permite clasificar la dietas con una puntuación de 0 a 100 de inadecuada (0-50), aceptable (51-60), buena (61-70), muy buena (71-80) y excelente (81-100) (Kennedy y col., 1995). En esta memoria de Tesis Doctoral se ha escogido el punto 70 para discernir entre dieta adecuada o prudente y dieta no adecuada o incorrecta (Kennedy y col., 1995) (Tabla 3.4).

#### CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN SIMPLIFICADO DE ADHERENCIA A DIETA MEDITERRÁNEA.

Otro parámetro que se ha utilizado para evaluar la calidad de la dieta fue la ADM, que tiene en cuenta el consumo o no de alimentos típicos de la Dieta Mediterránea, ya definido en el apartado de Introducción. En esta memoria de Tesis Doctoral, de los 14 factores que se proponen en el estudio PREDIMED (Estruch y col., 2006), se ha prescindido de uno de ellos por considerar que las gestantes no deben tomar vino o bebidas alcohólicas, de modo que la calificación de adherencia adecuada se considera cuando al menos se cumplen 7 de los 13 factores seleccionados (Tabla 1.6).



**Tabla 3.4.** Detalle de los criterios tomados en consideración en el Índice de Alimentación Saludable

<b>Índice de Alimentación Saludable</b>	<b>Puntuación<sup>a</sup> (intervalo, valor)</b>
Cereales, granos y legumbres (6, 8 y 10 raciones, respectivamente) <sup>a</sup> 1 ración: pan=30-40g; galletas y magdalenas, roscos, etc.=40-50g; cereales de desayuno=30-40g)	0 a 10 (0-10)
Vegetales (3, 4 y 5 raciones, respectivamente) <sup>a</sup> 1 ración: escarola, lechuga, espinaca, etc.= 100-150g; patatas, tomates, zanahorias, etc.=100-150g	0 a 5 (0-10)
Frutas (2, 3 y 4 raciones, respectivamente) <sup>a</sup> ; 1 ración: frutas =150-200g o zumo natural de fruta =100-150g	0 a 4 (0-10)
Productos lácteos. 1ración: leche=200-250mL, yogurt=125mL, queso fresco=60g; queso curado o semicurado=30-40 g	0 a 3 (0-10)
Carne, huevos y pescado (2, 2,4 y 2,8 raciones, respectivamente) <sup>a</sup> . 1 ración: carne y vísceras=100-125 g; pescado=100-150 g; huevo=1 unidad	0 a 3 (0-10)
Grasa total (%En)	>45 a <30%En (0-10)
Grasas saturadas (%En)	>15 a <10%En (0-10)
Colesterol (mg/día)	>450 a <300 (0-10)
Sodio (mg/día)	>4800 a <2400 (0-10)
Variedad de la dieta (número de alimentos por 3 días)	<6 a >16 (0-10)

<sup>a</sup>Adaptado de Ortega y col. (2004) a las ingestas recomendadas para 1.600, 2.200 y 2.800 kcal. Los valores corresponden a parte comestible. En: energía.

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

### TAMAÑO MUESTRAL

El poder estadístico de las diferentes determinaciones realizadas y su aplicación en las diferentes publicaciones se realizó con el sistema informático SAS Power and Sample size versiones 9, 9.2 y 12.3 (SAS Institute Inc. Cary, Carolina del Norte, USA). Se consideró para los parámetros de mayor relevancia, como glucosa, insulina y HOMA para sensibilidad/resistencia a la insulina y CT y CT/HDLc en los marcadores de RCV. Esto es necesario cuando se comparan grupos pequeños de individuos. El asesoramiento para determinar la validez del tamaño muestral se realizó en el Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid con la colaboración de D<sup>a</sup> Carmen Bravo.

El estudio estadístico de esta Tesis Doctoral se realizó con el programa estadístico SPSS/PC+ versiones 11.0 y 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Primeramente se realizó un análisis univariante obteniendo para cada variable una serie de estadísticos generales como número de individuos, tanto por ciento, media, desviación estándar y percentiles.

Todas las variables analizadas se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si seguían o no una distribución normal. Ya que algunas de estas variables bioquímicas no se ajustaban a distribuciones gaussianas, en algunos casos se hizo un ajuste logarítmico de los datos para poder emplear test paramétricos; mientras que en otros, se prefirió estudiarlas mediante test no paramétricos y expresarlas como mediana junto al intervalo intercuartílico percentil 25-percentil 75 ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ). Para las comparaciones no paramétricas que incluyeron estas variables se utilizaron los test de la  $U$  de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.

El análisis de las correlaciones entre variables continuas con distribución no paramétrica se llevó a cabo mediante la correlación de Spearman.

Las comparaciones paramétricas se realizaron mediante test de ANOVA de una vía seguido por análisis *post hoc* de Bonferroni.

Se ha realizado una  $t$  de Student de doble cola que ha permitido comparar las medias de distintos parámetros de los niños respecto a las niñas, entre distintos grupos de peso, entre distintos grupos de edad gestacional, y entre diferentes percentiles de CT. Con este test se obtiene para la diferencia de las medias un valor denominado " $P$ " que indica la significación estadística de esta diferencia. Los límites considerados como diferencia significativa fueron  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ , es decir, probabilidad de error al aseverar esta diferencia del 5%, 1% y 0,1% respectivamente. Cuando  $P$  estaba entre 0,05 y 0,07 se ha considerado la comparación en el borde de la significación estadística ó marginalmente significativa.

Para estudiar la relación y dependencia entre variables con distribución paramétrica se aplicó el test producto-momento de Pearson. La relación entre dos variables se puede cuantificar con una cifra comprendida entre  $\pm 1$ . Cuanto mayor sea la correlación entre dos variables más próximo será este valor a 1 de tal forma que si las variaciones de una de ellas implican variaciones en el mismo sentido de la otra el valor tenderá a +1 y si las variaciones son en sentido contrario tenderá a -1. El nivel de significación de este índice de correlación se ha calculado con una *t* de Student de modo que la probabilidad de error se ha expresado con “*P*”, no aceptándose como válida ninguna correlación con  $P > 0,05$ , lo que viene a indicar que la probabilidad de correlación significativa es menor del 5%.

A continuación se detallan, para cada una de las publicaciones incluidas en esta memoria de Tesis Doctoral, los aspectos específicos tenidos en cuenta en el análisis estadístico.

**PUBLICACIÓN 3: Eur J Pediatr 2009;168:281-288:** El tamaño de la muestra era adecuado para estimar las medias de la población (95% intervalo de confianza) con una precisión del 6-11% para determinar valores medios para glucosa, GH, IGF-1 y QUICKI, 25-27% para insulina, insulina/cortisol y glucosa/insulina y 35-45% para HOMA-IR y HOMA-IS. Teniendo en cuenta la distribución por sexo de los neonatos, la precisión se estimó en el 8-17% para la glucosa, GH, IGF-1 y QUICKI, en el 35-37% para glucosa/insulina e insulina/cortisol y en el 40-50% para HOMA-IR y HOMA-IS. Para comprobar la significación de la comparación entre cuartiles se empleó la prueba *U* de Mann Whitney. Se han estudiado las correlaciones de Spearman entre variables.

**PUBLICACIÓN 4: Eur J Pediatr 2013;172: 883-894.** El estudio se diseñó para tener un poder estadístico de al menos 90% ( $\alpha = 0,05$ ) para detectar diferencias de 7 mg/dL en CT, 0,25 en TC/HDLc, 4,0 mUI/L en insulina y 1,5 en HOMA-IR entre niños y niñas. El tamaño de la muestra era adecuado para comprobar diferencias absolutas de 9 mg/dL en CT, 0,30 en TC/HDLc, 4,5 mUI/L en insulina y 2,5 en HOMA-IR con un poder de 72 y 60% entre neonatos con glucosa y TG altos vs glucosa y TG bajos y glucosa alta con HDLc bajo vs. glucosa baja con HDLc alto respectivamente. Se aplicó ANOVA de una vía seguida de un *post hoc* de Bonferroni para hacer comparaciones múltiples. Se comprobaron las correlaciones de Spearman entre los datos antropométricos y bioquímicos de los neonatos. Se ha empleado una tabla de contingencia para determinar la sensibilidad y el valor predictivo del uso combinado de las concentraciones de glucosa y TG así como de glucosa y HDLc, como se ha indicado previamente en las concentraciones de marcadores de resistencia o sensibilidad a insulina y niveles de lipoproteínas en diferentes puntos de corte. Para comparar la predictibilidad del método de la combinación de glucosa/TG y glucosa/HDLc se han construido curvas ROC (receiver operating characteristics) en las que los niveles de marcadores de sensibilidad/resistencia y las lipoproteínas y el grupo de probabilidad pronóstica se analizaron como variables predictivas. El área bajo la curva (AUC) representa el poder discriminativo de la prueba. Se espera que los valores estén entre 0,5 (sin capacidad discriminatoria) y 1,0 (la máxima exactitud en la detección).

**PUBLICACIÓN 5: Nutr Hosp 2011;26:1447-1455:** La distribución de los neonatos en los grupos del primer y cuarto cuartil permitía detectar diferencias de 2 en HOMA-IR con un poder estadístico del 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Se hizo ANOVA de una vía seguida de un *post hoc* de Bonferroni para comparar los niños de los cuartiles 1 y 4 de insulina nacidos de madres con la tolerancia a la glucosa alterada o no. Se realizó un análisis de regresión múltiple para identificar aquellas variables que pudieran explicar la variabilidad de la insulina al nacimiento incluyendo: edad materna, glucosa basal, glucosa tras el test de O'Sullivan, sexo del neonato, edad gestacional, peso al nacimiento, talla al nacimiento, IMC, IP, test de Apgar a los minutos 1 y 5, glucosa, cortisol, GH e IGF-1. Se llevó a cabo la prueba de la *U* de Mann Whitney para comparar los grupos de IAS y los grupos de neonatos de los cuartiles 1 y 4 de las madres con la tolerancia a la glucosa alterada frente a los que nacieron de madres con la tolerancia a la glucosa normal. También se usó la prueba no paramétrica de Kurskal Wallis para comparaciones múltiples en caso de variables con distribución no normal. El porcentaje de la distribución entre los grupos se realizó con las pruebas del Chi cuadrado o la *F* de Fisher.

**PUBLICACIÓN 6: Eur J Clin Nutr 2012;66:1008-1015.** El tamaño de la muestra era adecuado para estimar diferencias absolutas de 2,5 en HOMA-IR y 4 mUI/L en insulina con un poder estadístico de 82 y 70% ( $\alpha = 0,05$ ) entre los neonatos de los grupos de dieta HEI  $\leq 70$  y HEI  $> 70$ . Y entre los grupos MDA  $< 7$  y MDA  $\geq 7$  respectivamente. Para los cálculos se han asumido desviaciones estándar de 3 y 1 para HOMA-IR y de 6 y 2 mUI/L para insulina en los neonatos que pertenecían al grupo de baja y alta puntuación de dieta respectivamente. Se realizó la prueba de la *U* de Mann Whitney para comparar las características de la dieta y los marcadores de sensibilidad o resistencia a la insulina en los diferentes grupos de neonatos. Se ha calculado el riesgo relativo para los neonatos con niveles elevados de glucosa, insulina o HOMA-IR, o niveles bajos de QUICKI en los grupos de dieta "inadecuada" frente a los grupos de dieta "adecuada" y los valores exactos de *P* de una cola (one tailed) para los riesgos relativos significativamente diferentes ( $RR > 1$ ). También se ha comprobado el posible efecto de muchos factores confundentes que podrían modificar los hábitos alimentarios y/o la sensibilidad a la insulina. La relación entre diferentes parámetros se ha obtenido con la prueba de rangos de Spearman.

**PUBLICACIÓN 7: European Journal of Nutrition 2014 doi: 10.1007/s00394-014-0798-5.** El CT y la tHcys neonatales se consideraron como las variables más importantes. El tamaño de la muestra era el adecuado para estimar diferencias absolutas de 10 mg/dL en CT y de 2 mg/dL en tHcys con un poder estadístico del 79% ( $\alpha = 0,05$ ) entre los neonatos del grupo de ADM  $< 7$  y los del grupo de ADM  $\geq 7$ . Para estos cálculos se asumieron DS medias de 10 mg/dL para CT y de 2 mg/dL para tHcys en los neonatos. Se analizaron correlaciones-momento de Pearson entre los parámetros lipídicos, lipoproteicos y tHcys, y la puntuación de ADM en el embarazo. Para comparar las características de la dieta y los marcadores lipídicos y lipoproteicos en los diferentes grupos de neonatos se llevó a cabo la prueba de la *t* de Student seguida del ajuste de Levene. Los valores de los percentiles 25 y 75 de CT, LDLc, HDLc; Apo A1, Apo B, CT/HDLc, Apo A1/Apo B y tHcys para definir neonatos con alta o baja concentración de estos parámetros se tomaron de los obtenidos por Gesteiro y col. (2013) en una población de neonatos seleccionados. Se ha descartado el efecto de factores confundentes que podrían modificar los

hábitos dietéticos y/o el perfil lipídico, lipoproteico o de la tHcys, como los suplementos dietéticos y otros.

**PUBLICACIÓN 8: Eur J Ped 2011;170:1551-1558.** El tamaño de la muestra en los grupos de polimorfismos de APOA5 era adecuado para comprobar diferencias absolutas de 0,75 en HOMA-IR con un poder del 85% ( $\alpha = 0,05$ ) entre los neonatos que pertenecían a los diferentes grupos, aceptando un error estándar global del 20% para los cálculos. Cuando los grupos se basaban en los polimorfismos de los niños y las madres, el tamaño de la muestra era adecuado para comprobar diferencias absolutas de 0,75 en HOMA-IR con un poder superior al 60% ( $\alpha = 0,05$ ) entre los miembros de los grupos. Se empleó la prueba de la *t* de Student para comparar los datos de los individuos portadores del alelo W con los de los homocigotos para el alelo S. Para comparar más de dos grupos y corregir las pruebas múltiples se hizo la prueba de ANOVA de una vía seguida de las pruebas *post hoc* de Bonferroni.

**PUBLICACIÓN 9: FTO. 2014. Enviada a Eur J Nutr.** Los datos se ajustaron en función de la glucosa materna después del test de O'Sullivan para evitar su posible efecto confundente. La glucosa, insulina y CT neonatales se consideraron como variables principales. Teniendo en cuenta la prevalencia del polimorfismo rs9939609 del gen FTO en la población mediterránea, este trabajo tuvo un poder estadístico de al menos el 85% ( $\alpha = 0,05$ ) para detectar diferencias entre los grupos de portadores del alelo A y homocigotos para el alelo T de 12 mg/dL para CT, 3 mUI/L para insulina y 20 mg/dL para glucosa. El poder para comparar los grupos de madre y neonato asociados fue superior al 70%. La interacción entre los polimorfismos materno y neonatal se comparó en tres grupos mediante ANOVA univariante (neonato portador de A\* madre portadora de A; neonato portador de A\* madre homocigota de T, y neonato homocigoto de T\*cualquier genotipo materno), seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni.

## ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo de estudio cumplía la última actualización de las normas de la declaración de Helsinki (Goodyear y col., 2007) y la legislación española sobre investigación clínica en humanos. El estudio fue aceptado por la Dirección del Hospital de Mérida y fue aprobado por la Comisión de Bioética del Hospital de Mérida.

Las madres que participaron en la valoración nutricional y en el análisis genético, recibieron información acerca de los objetivos y procedimientos del estudio, y firmaron un consentimiento informado antes de formar parte del proyecto.

## **4. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### PUBLICACIÓN 1

Sánchez-Muniz FJ, Gesteiro E, Espárrago M, Rodríguez-Bernal B, Bastida S.

La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de Diabetes mellitus y síndrome metabólico.

**Nutrición Hospitalaria** 2013; 28: 250-274.

ISI Web. JCR. (2013). Índice de impacto: 1.250 (62 de 78 en Nutrition and Dietetics)

---

### Resumen

El embarazo es una etapa de vital importancia, donde tienen lugar múltiples procesos hiperplásicos, hipertróficos, de adaptación metabólica y de preparación para la vida extrauterina. En esta revisión se analizan aspectos centrales de la nutrición durante el embarazo, tanto en la etapa embrionaria como fetal. Se exponen los cambios más importantes que tienen lugar en el páncreas fetal, con especial atención a la susceptibilidad de este órgano protagonista en la homeostasis de la glucosa para enfrentarse a cambios nutricionales durante su desarrollo y maduración. Se comentan algunos estudios realizados en modelos animales y en la especie humana, analizando el papel de la nutrición materna sobre la masa de células-  $\beta$ , la producción de insulina y otras hormonas y la sensibilidad a la insulina. Se detallan aspectos sobre las hipótesis del genotipo y fenotipo ahorrador, señalando que la hiponutrición produce adaptaciones metabólicas que permiten al futuro ser medrar en un ambiente de nutrientes y energía reducidos. Se revisan algunos aspectos de la hipótesis de Barker y se indica que la adaptación metabólica que preconiza es un arma de doble filo en el mundo actual de abundancia que nos encontramos. Por último se revisan trabajos tanto de nuestro grupo como de otros autores, en aspectos menos estudiados, que relacionan la calidad de la dieta materna con alteraciones de marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina en el momento del parto. En especial se estudia el papel de la relación ácidos grasos saturados/hidratos de carbono y la de ácidos grasos omega-6/omega-3 en el marco de dietas inadecuadas bajo el punto de vista del índice de alimentación saludable o de la adherencia a la dieta mediterránea que condicionan en el neonato un perfil de resistencia a la insulina. La revisión incide además en que los hábitos nutricionales deben estar fuertemente instaurados ya en la etapa pregestacional para asegurar una buena alimentación desde las primeras semanas del embarazo, y asegurar un desarrollo fetal, y en particular pancreático, que posibilite una homeostasis adecuada de la glucosa durante el embarazo y en etapas posteriores de la vida evitando, o al menos frenando, el desarrollo y la instauración de enfermedades degenerativas asociadas con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

Palabras clave: Embarazo. Páncreas fetal. Placenta. Nutrición materna. Marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina. Neonatos.







## Revisión

# La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico

F. J. Sánchez-Muniz<sup>1</sup>, E. Gesteiro<sup>2</sup>, M. Espárrago Rodilla<sup>2</sup>, B. Rodríguez Bernal<sup>1</sup> y S. Bastida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España. <sup>2</sup>Servicio de Laboratorio. Hospital de Mérida. Mérida. Badajoz. Extremadura. España.

## Resumen

El embarazo es una etapa de vital importancia, donde tienen lugar múltiples procesos hiperplásicos, hipertróficos, de adaptación metabólica y de preparación para la vida extrauterina. En esta revisión se analizan aspectos centrales de la nutrición durante el embarazo, tanto en la etapa embrionaria como fetal. Se exponen los cambios más importantes que tienen lugar en el páncreas fetal, con especial mención de la susceptibilidad de este órgano central en la homeostasis de la glucosa a enfrentarse a cambios nutricionales durante su desarrollo y maduración. Se comentan algunos estudios realizados en modelos animales y en la especie humana con especial mención del papel de la nutrición materna sobre la masa de células-β, la producción de insulina y otras hormonas y la sensibilidad a la insulina. Se detallan aspectos sobre las hipótesis del genotipo y fenotipo ahorrador, señalando que la hiponutrición causa adaptaciones metabólicas que permiten al futuro ser medrar en un ambiente de nutrientes y energía reducido. Se revisan algunos aspectos de la hipótesis de Barker y se indica que la adaptación metabólica que preconiza es un arma de doble filo en el mundo actual de abundancia que nos encontramos. Por último se revisan trabajos de nuestro grupo y de otros autores, en aspectos menos estudiados que relacionan la calidad de la dieta materna con alteraciones de marcadores de resistencia/sensibilidad a la insulina en el momento del parto. En especial se estudia el papel de la relación ácidos grasos saturados/hidratos de carbono y la de ácidos grasos omega-6/omega-3 en el marco de dietas inadecuadas bajo el punto de vista del índice de alimentación saludable o de la adherencia a la dieta mediterránea que condicionan en el neonato un perfil de resistencia a la insulina. La revisión incide además en que los hábitos nutricionales deben estar fuertemente instaurados ya en la etapa pregestacional para asegurar una buena alimentación desde las primeras semanas del embarazo, y asegurar un desarrollo fetal y en particular pancreático que posibilite una homeostasis adecuada de la glucosa durante el embarazo y en etapas posteriores de la vida evitando, o al menos frenando, el desarrollo y la instauración de enfermedades degenerativas asociadas con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

(Nutr Hosp. 2013;28:250-274)

DOI:10.3305/nh.2013.28.2.6307

Palabras clave: Embarazo. Páncreas fetal. Placenta. Nutrición materna. Marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina. Neonatos.

**Correspondencia:** Francisco J. Sánchez-Muniz.  
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición).  
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.  
28040 Madrid. España.  
E-mail: frasan@farm.ucm.es

Recibido: 9-XI-2012.  
Aceptado: 12-XII-2012.

## MATERNAL NUTRITION DURING PREGNANCY CONDITIONS THE FETAL PANCREAS DEVELOPMENT, HORMONAL STATUS AND DIABETES MELLITUS AND METABOLIC SYNDROME BIOMARKERS AT BIRTH

### Abstract

Pregnancy is a vital period where several hyperplastic, hypertrophic processes together with metabolic adaptation and preparation for extra-uterine life take place. Present review accounts for central aspects of nutrition throughout gestation on the embryonic and fetal periods. It is centered in the major changes occurring in fetal pancreas, with special mention to the susceptibility of this main glucose homeostasis organ to support nutritional changes during maturation and development. Studies performed in animal models as human are commented considering the role of maternal nutrition on β-cell mass size, insulin and other pancreatic hormones production, and insulin sensitivity. Details of both the thrifty genotype and phenotype hypothesis are given, indicating that hypo/subnutrition causes metabolic adaptations that permit the future body to grow and develop itself in limited environmental and energetic conditions. The Barker hypothesis is considered suggesting that this metabolic hypothesis is a double-edged sword in the actual abundance World. Lastly the review, taking into account our own research and other papers, analyses less known aspects that relate maternal diet with insulin resistance/sensitivity markers at delivery. Particularly the role of the saturated fatty acid/carbohydrate and omega-6/omega-3 ratios in the frame of maternal diet is reviewed considering the quality of those diets under the Healthy Eating Index and the Adherence to Mediterranean Diet scores and the relationship with insulin resistance profile at birth. Present review ends indicating that nutritional habits should be strongly stated before gestation in order to assure a proper nutrition since the first moment of pregnancy. This will support an adequate fetal and pancreatic growth and development, and in turn, adequate glucose homeostasis during pregnancy and later in life, slowing down or preventing from degenerative diseases related with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus.

(Nutr Hosp. 2013;28:250-274)

DOI:10.3305/nh.2013.28.2.6307

Key words: Pregnancy. Fetal pancreas. Placenta. Maternal nutrition. Insulin sensitivity/resistance biomarkers. Neonates.

## PUBLICACIÓN 2

Gesteiro E, Sánchez-Muniz FJ, Espárrago M, Rodríguez-Bernal B, Bastida S.

Dieta Mediterránea y Embarazo

En: "The Mediterranean Diet. An Evidence-Based Approach" Capítulo 44.

Editado por Preedy VR y Watson RR. Elsevier Inc. Amsterdam. 2015. pp. 491-503.

---

### Resumen

El embarazo es un periodo crucial en el que tienen lugar procesos de crecimiento, desarrollo, maduración y adaptaciones metabólicas. Este capítulo revisa aspectos fundamentales de la nutrición durante el embarazo en las etapas embrionaria y fetal. Se profundiza en la teoría del fenotipo ahorrador, indicando que una nutrición deficitaria produciría adaptaciones metabólicas que permitirían al feto crecer y desarrollarse en un ambiente escaso en nutrientes y energía. Se considera también la hipótesis de Barker, sugiriendo que estas adaptaciones también tienen su riesgo si la situación posnatal es de abundancia. Se revisan y comentan las recomendaciones dietéticas actuales para mujeres gestantes, señalando la conveniencia de seguir una dieta de tipo Mediterráneo en este periodo. Se analizan los efectos particulares que este perfil dietético tiene sobre el crecimiento fetal y placentario, la glucemia, insulinemia, sensibilidad/resistencia a la insulina y metabolismo lipoproteico, considerando la dieta en su totalidad, y el papel de la carga glucémica y los cocientes ácidos grasos saturados/hidratos de carbono y omega-6/omega-3. El capítulo termina indicando que los hábitos dietéticos saludables deben estar bien instaurados antes de la concepción con el fin de asegurar una nutrición adecuada desde el inicio de la gestación, y que en la segunda mitad del embarazo los cambios que se llevan a cabo en cuanto a la dieta son mínimos. Esto asegurará que tanto el crecimiento como el desarrollo fetales son adecuados, así como el metabolismo lipoproteico y la homeostasis de la glucosa durante el embarazo y también en la vida extrauterina, disminuyendo o incluso previniendo enfermedades degenerativas.

Palabras clave: Feto. Marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina. Metabolismo lipoproteico. Nutrición materna. Dieta Mediterránea. Neonatos. Embarazo.



# Mediterranean Diet and Pregnancy

Eva Gesteiro<sup>1</sup>, Francisco J. Sánchez-Muniz, PhD<sup>2</sup>, Manuel Espárrago Rodilla, PhD<sup>1</sup>, Beatriz Rodríguez Bernal<sup>2</sup> and Sara Bastida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital de Mérida, Mérida, Badajoz, Spain. <sup>2</sup>Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

## ABBREVIATIONS

<b>Apo</b>	apolipoprotein
<b>CHD</b>	coronary heart disease
<b>CHO</b>	carbohydrate
<b>CVD</b>	cardiovascular disease
<b>DHA</b>	docosahexaenoic acid
<b>GD</b>	gestational diabetes
<b>HDL</b>	high density lipoproteins
<b>HOMA-IR</b>	homeostatic model assessment-insulin resistance
<b>IGF</b>	insulin like growth factors
<b>LPL</b>	lipoprotein lipase
<b>MDA</b>	Mediterranean diet adherence
<b>SGA</b>	small for gestational age
<b>SFA</b>	saturated fatty acids

## INTRODUCTION

Pregnancy is a very complex period where growth, development, and maturity take place [1]. The future body, in addition to increasing its cellular mass, progressively acquires functional capabilities that would permit it to live and grow out of the mother's womb. From fecundation to delivery, a plethora of processes takes place programming the foetus for *extra-utero* life. Figure 1 summarizes some major factors affecting placental and fetal growth [2].

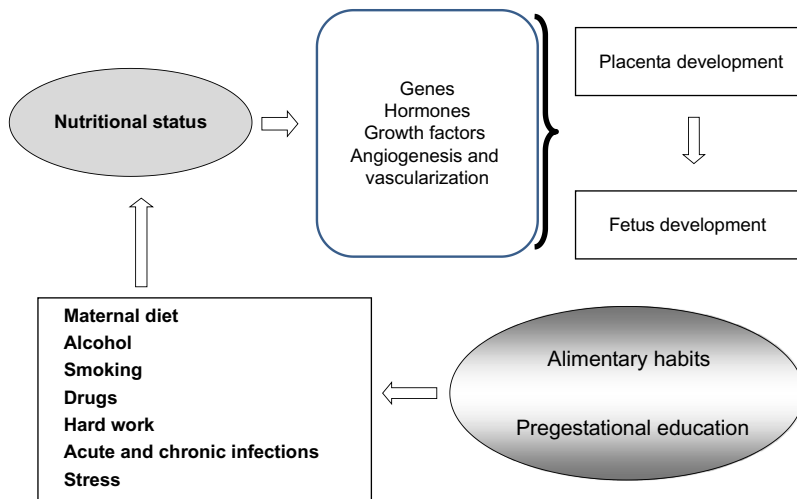
The knowledge of heritance diseases or those related to earlier chromosome aberrations were central aspects of perinatal research and neonatal health knowledge. However, more recently, the Barker et al. [3] and Palinski and Napoli [4] hypothesis, among others, has promoted several studies that consider the mother–fetus interaction in its multiple sides and analysed several factors controlling the growth, adjusted or problematic, of the new body [2–4].

During pregnancy we can distinguish two main periods, the embryonary one, that takes place during the first 8 weeks of pregnancy and the fetal period that goes from the 9th week of pregnancy to the delivery (Figure 2) [1,5].

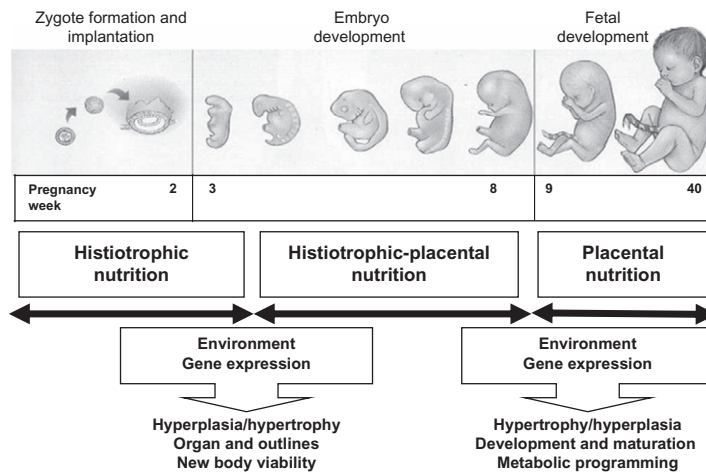
The first 2 weeks of the embryonary period are highly critical and make the embryo very vulnerable to an adverse environment (altered hormone concentration, low blood and nutrient availabilities) with very early prenatal death occurring in some cases. From weeks 2 to 8, the embryo is very sensitive to teratogenic drugs, as the formation of the embryonary outlines is occurring. Finally, during the fetal period less severe morphological alterations but important physiological adaptations occur. This period is susceptible to adjustments that induce the fetal programming which will condition the optimum or problematic new body [1,5,6] (Figure 2).

According to Herrera et al. [7] two clear periods can be distinguished during pregnancy in the future mother. The first one is anabolic and consists of energy reservoir formation, lasting two thirds of the whole pregnancy. It is followed by a second period where maternal stores are mobilized and the fetus exponentially grows and it is prepared for delivery.

During the first period a marked increase of insulin level and sensitivity occurs in the mother, with parallel increases of placenta size, amniotic volume, protein content and fat stores; however, the fetus weight gain is small in comparison to that of the mother. During the store distribution period, a physiological increase of insulin resistance and insulin degradation takes place in the mother, in parallel to the exponential fetal growth that partially or totally blocks the gain rhythm of



**FIGURE 1** Relationship and importance of women's habits, education, and pre-gestational diet on fetal and placental developments. The embryo and fetus growth/developments are highly dependent on the future mother's healthy habits, nutritional status, and, thus, on her diet. The correct weight gain during pregnancy conditions an adequate fetal and placental growth. During the fetal period, the placenta matures and establishes itself as an independent organ, filter and connector between mother and fetus. The placenta participates in very important functions as nutrient transport, hormone synthesis, and vascular resistance affecting the foetus development, that, in turn, induces a fetal metabolic modulation or "programming." Adapted from Sánchez-Muniz et al. [1] with *Nutrición Hospitalaria* permission.



**FIGURE 2** Relationship between gestation, type of nutrition and development of embryo and fetus. Following fecundation, during the 2–3 first weeks, singular changes take place: morula and blastocyst formation, trophoblastic invasion, starting specialization of the primal embryonic layers: entoblast (or endoblast), ectoblast, and mesoblast. In this stage the nutrition is *histiotrophic* and highly dependent on maternal uterus-available substrates. Later the so-called embryonic phase is established, in which the formation of organ and tissues outlines takes place. It is a mainly hyperplastic phase in which the placenta is still immature, and the embryo very sensitive to teratogenic factors; thus possibly important morphological modifications occur. In this phase the nutrition is *histiotrophic-placental*. The fetal phase starts in didactic terms at the 9th week. The placenta becomes mature and works as an "independent and central" organ for fetus nutrition. It is the so-called *placental nutrition*. At week 10, pancreatic islets are evident and at week 20 insulin secretion is well developed. This is a stage which is predominantly *hypertrophic*, with *development and maturation of organ and tissues and their functionalities*. Being depending on the uterus–placenta environmental conditions, the fetal metabolic programming takes place. Adapted from Sánchez-Muniz et al. [1] with permission of *Nutrición Hospitalaria*.

maternal stores. This metabolic situation assures the availability of glucose for the maternal and fetal brains and addresses glucose to the mammary gland, reducing the uptake of glucose by other maternal tissues [7,8]. When glucose homeostasis is not physiologically balanced, changes and adaptation (programming) take place during pregnancy, predisposing the individual to degenerative diseases later in life. In some non-diabetic women, an alteration of carbohydrate (CHO) metabolism occurs during pregnancy; thus, although fasting glycemia is normal, after a CHO load, the glycemia increases over normal values. This situation is rather more frequent at the end of pregnancy and is known as gestational diabetes (GD) [9].

GD is defined as any level of glucose intolerance that is first-time diagnosed during pregnancy. Most of the times this is a transitory situation in which the pregnant woman is unable to produce enough insulin or become resistant to this hormone inducing increments in the glycemia [1,9]. GD is frequently diagnosed in the second trimester of gestation, when increased levels of insulin-antagonic hormones (e.g. chorionic somatotropin) are present [8]. These hormones modify the sensitivity of peripheral receptors of insulin, addressing glucose to the fetus and increasing mobility of maternal adipose tissue lipids.

GD has been studied in detail in rodents [10], with results being extrapolable to human. In general, rat offspring from mothers with moderate GD secrete less insulin and their glucose tolerance decreases, while in case of severe GD, skeletal muscle and liver insulin resistance occurs in the offspring. The non-treated/non-balanced GD induces the embryo and fetus to hyperglycemia, affecting fetal tissues and particularly growth, development and maturation of fetal pancreas [11].

Thus, diabetic mothers transfer to their offspring a diabetogenic tendency that is silent in normal conditions but evident when glucose metabolism increases are demanded. In addition obesity and other factors promoting insulin resistance

seem to increase the type 2 diabetes mellitus after GD [8,11], while GD women's offspring show increased obesity, glucose intolerance and diabetes at the end of their adolescence and at early adult age [9]. Gestation in a diabetic woman is not only related to maternal risk but also to prematurity, intrauterus excessive growth, respiratory distress syndrome and congenital defects that increase neonatal mortality.

Moderate GD gives rise to heavy neonates with hyperplastic and hypertrophic pancreas [10]. When severe GD is present the hypertrophy is accompanied by fetal hyperinsulinaemia, together with permanent and excessive stimuli of pancreas, negatively affecting its functionality and giving rise to hypoglycemia, metabolism decrease and perinatal microsomia [10].

Thus, glycemia and glucose tolerance control are of maximal importance during pregnancy. Between weeks 24 and 28 of gestation it is preceptive nowadays to perform a glucose tolerance test by following the O'Sullivan test [12]. It consists of measuring glycemia 1 h after an oral administration of 50 g of glucose. When glycemia is higher than 140 mg/dL an extra 100 g of glucose load is given, measuring glycaemia values during 3 h at 1 h intervals. GD is diagnosed when at least two glycemia measurements are equal or surpass the reference levels [1,9]. All the previously comments stress the importance of nutritional or even pharmacological treatment in GD.

## NUTRITION DURING GESTATION

During pregnancy three phases can be defined: histiotrophic, histiotrophic-placental and placental (Figure 2). The histiotrophic phase implies that the embryo takes oxygen and nutrients directly from the uterus. Till the 18th day of gestation the materno-fetal circulation outline is not evident; thus, the maternal status during this period is quite similar to that of pre-pregnancy, and will be vital for the viability of the embryo and for the adequate embryogenesis starting [1,5]. On day 6 after implantation, cell-line specialization has started and the ectoblast and the entoblast or endoblast are evident, while the mesoblast still does not exist. A cluster of cells, the sincitio-trophoblast starts invading the maternal uterus with the production of angiogenic and transcription factors that will give origin to, among others, the placenta and the materno-fetal circulation [1,5]. After the first third of gestation in man, the placenta has matured as a main organ and performs several processes of substrate synthesis, transference and modification.

Although the fetus is mainly specialized for glucose utilization [13], proteins, omega-6 and omega-3 fatty acids, minerals, and vitamins are also essential [1,8]. Gil-Sánchez et al. [14] have reviewed the placental transference of omega-3 fatty acids and more specifically of docosahexaenoic acid (DHA). It seems clear that placenta as other fetal tissues has the enzymatic equipment to obtain such fatty acids from the triglycerides of maternal very low density lipoproteins [7,15], and genetics, epigenetics and nutritional modifications will condition their transference and bioavailability [7,14]. Recently the central role of vitamin D, a key vitamin for cell differentiation and apoptosis, on placenta and fetus development has been suggested [16].

Pregnancy nutrition should be not understood under a *passive* point of view where the support of nutrients and other substances assure structure turnover and growth but a process where energetic, structural and metabolic functions are induced by fine interactions between those substances and our genes that make nutrient functionality easier and adequate [17]. Thus, silent mutations or epigenetic mechanisms may play important role during gestation. Thus future researches in epigenetic mechanisms underlying phenotype modification modulated by nutrients are demanded [17].

## GENERAL NUTRITION REMARKS DURING PREGNANCY

Tables 1 and 2 summarize some major nutritional objectives to take into account during pregnancy [1,8,18] as to avoid eating for two, and to slightly increase the meal size and the number of meals throughout the day instead. Last meal or "post-dinner" snack seems highly recommendable, as it would contribute to the avoidance of possible hypoglycemia induced between dinner and breakfast, assuring adequate fetal glucose use and maternal stores of proteins and fats [7].

Nutrition during pregnancy should be varied, adequate, balanced and simultaneous. Thus, each meal must contain dishes supporting CHO, proteins, lipids, micronutrients and bioactive compounds, assuring complementation and synergies of nutrients, improving the digestive system health of the mother and her microbiota. As alcohol blocks several metabolic functions and placenta is defective in alcohol deshydrogenase, the ethanol consumption must be maximally restricted to prevent the embryo and fetus from its negative effects on growth and development [1].

The European Food Security Agency (EFSA) has recommended decreasing the consumption of some large fatty fish due to their potential high mercury content. Unfortunately, the news has been incorrectly understood and many people and pregnant women have drastically reduced fatty fish consumption. This nutritional aspect is of major importance as fatty fish contain omega-3 fatty acids that are not present in other foods. Thus, decreasing fatty fish intake, the concentration of omega-3 fatty acids would decrease in both mothers and fetus.



**TABLE 1** General Guidelines and Recommendations to be Considered During Pregnancy

Personalized diet Maintain, when possible, personal desires and dislikes Avoid raw or poorly cooked food consumption (meat and its derivatives, fish) due to the increased alimentary risk
Drink water in adequate amount (8–9 glasses/day) during meals and throughout day
Have 5 or more meals a day to avoid hypoglycemic peaks, vomits and pyrosis Delay bed time at least two hours after dinner to reduce the esophageal reflux A post-dinner snack is much recommended especially when long gaps between dinner and breakfast exist Avoid “picks” between meals
In general terms, during pregnancy diet will be balanced with a light increase in the meal size It is recommended to consume 4–6 cereal servings, 5–7 fruit pieces plus vegetables servings, 3–4 milk glasses or dairy products, and 2½ protein food servings daily
Food distribution should be made according to the number of meals. An example of distribution for a total of 6 meals regarding to energy contribution could be: breakfast, 20%, midday snack, 10%, lunch, 30–35%, afternoon snack, 10%, dinner, 20–25%, post-dinner, 5% Breakfast, lunch and dinner should be balanced and contain as many different food groups as possible
Select food according to quality and nutrient densities (nutrient/1000 kcal)
Avoid and maximally limit alcoholic beverages especially during the embryo stage. Non-alcoholic beverages called “alcohol-free” contain reduced amount of ethanol (normally <1%) that has to be considered
Limit consumption of refined carbohydrates and sweet beverages containing or not caffeine
Reduce the common salt consumption in the case of edema and/or hypertension
Obtain minerals and vitamins mainly from foods Avoid iatrogenic and indiscriminate multivitamin–mineral supplements Follow recommendations of a specialist regarding the supplements of iron, iodine, and folates. Iron would be consumed just when anemia is diagnosed. Vegetarian pregnant mothers should take B <sub>12</sub> vitamin supplements, being also adequate that of vitamin D and B <sub>6</sub> Control the calcium intakes, mainly in vegetarian women There exists competency between the absorption of some minerals. The iron excess affects the zinc absorption, and the one of zinc that of copper The excess of vitamin A is teratogenic (growth retardation, bifida spine risk). Adequate retinol equivalent ingest with β-carotenes The excess of vitamin B <sub>6</sub> , induces nervous system dysfunction The excess of vitamin C (>2 g/day) increases the scurvy risk in the neonates and ascorbate renal calculi, interfering with the placental estrogens and with the vitamin B <sub>12</sub> metabolism and absorption, inducing in pregnant women cephalalgia, fatigue, nausea, vomiting, hypoglycaemia and hypercholesterolaemia
Avoid smoking and drugs consumption Limit the consumption of contraindicated pharmacological drugs, particularly during embryonary and preconceptional periods
<b>Source:</b> Adapted from Sánchez-Muniz et al. [1] with Nutricion Hospitalaria Permission

The fetus is largely defective in the desaturase-elongase system; it does not support adequate levels of DHA in the nervous system and retina [19]. Recommended dietary allowances of energy and nutrients and/or adequate intakes during gestation are available, although there is not consensus among experts [20,21].

Energy should be increased between 8% and 15% with respect the pre-gestational diet. Some nutrients are increased up to 50% due to the raise of maternal and the conceptus demands. However, there are concerns about the convenience of increasing vitamin A and iron through the second half of gestation [1]. It is a usual practice prescribing iron, folate and iodine supplements during gestation [1]. Some relevant aspects of sources, energy contribution of macronutrients and concern about mineral or vitamins are given in Table 2.

## MEDITERRANEAN DIETARY PATTERN

Although a non-precise and accepted definition for Mediterranean diet exists, it is recognized that this was the most regular alimentary profile in the Mediterranean countries during the 1950s [22–24]. It is based on a high intake of vegetable products rich in complex CHO, olive oil and moderate of fish and other foodstuffs [22–26].

The major characteristics of this dietetic pattern are:

1. High bread, whole cereals, nuts and honey consumption.



**TABLE 2** Guidelines and Recommendations About Fibre Consumption, Macronutrient Energy Contribution and Other Nutritional and Dietetic Indexes to be Considered in Pregnancy

Proteins	Of good quality, at least 50% from animal origin Should provide 10–15%En. In circumstances 12–16%En depending on the gestation on-going and the age of the future mother
Carbohydrates	Eat carbohydrates from all food groups Reduce excessive consumption of refined foodstuffs Complex carbohydrates, 50–60%En. Simple carbohydrates <10%En
Fibre	Pregnancy induces natural constipation Consume all fibre type (from cereals, fruits, legumes, and vegetables) 30–35 g/day; 15–20 g/1000 kcal
Ethanol	Avoid throughout pregnancy
Fats	Use of olive oil preferred as the only culinary fat Avoid excess in consumption of food from animal origin AMDR, 20–35%En; U-AMDR, <35%En
Saturated fats	Avoid excessive consumption of lard, creams and commercial buns (pastries). Reduce maximally the intake of lauric, myristic, and palmitic acids U-AMDR: 10%En. It can be evaluated the convenience of reducing till <7%En
<i>Trans</i> fats	Reduce consumption of industrial fats containing trans fatty acids UL: <1%En
Polyunsaturated fatty acids	Moderate consumption Main sources are vegetables, nuts and fish U-AMDR: 6–11%En; AI: 2–3%En
Total Omega-6	Consume moderately. Main sources are vegetables and nuts 13 g/day; EAR: 2%En
Linoleic acid	Food sources should be vegetables and in minor amount seed oils, that would highly increase the energy contribution of omega-6 fatty acids AMDR, 2.5–9%En
Arachidonic acid	Foods are poor source of this fatty acid It is endogenously obtained from linoleic acid by the desaturase/elongase system, very active in pregnant women but defective in fetus
Total omega-3	Main sources: Oily fish and nuts Check the eating convenience of enriched food in omega-3 fatty acids Consume oily fish, at least twice a week, selecting fish of small size due to their lower mercury content. AMDR, 0.5–2%En
Linolenic acid	Main sources: nuts and some oils (e.g. soybean oil) L-AMDR, ≥0.5%En; 2 g/day
Eicosapentaenoic+docosahexaenoic acids	Main sources: oily fish AMDR for eicosapentaenoic acid+docosahexaenoic acid: 0.25–2% g/day
Omega-6/omega-3 ratio	No present ratio is specifically recommended by the WHO, meanwhile guidelines for omega-6 and omega-3 should be covered. However, ratios between 3/1 and 10/1 seem most adequate
Vitamin E/polyunsaturated fatty acids	0.6 mg/g

Amounts set for adults by FAO/WHO. (2010). The Joint FAO/WHO expert consultation on fats and fatty acids in human nutrition. FAO food and nutrition paper 91. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, ISSN 0254-4725. AI: adequate intake; AMDR, acceptable macronutrient distribution range; EAR, estimated average requirements; En, total energy; L-AMDR, lower level of acceptable macronutrient distribution range; U-AMDR: upper level of acceptable macronutrient distribution range; UL: upper level.

Adapted from Sánchez-Muniz et al. [1] with Nutrición Hospitalaria Permission

2. High consumption of legumes, vegetables, and fresh fruits.
3. Culinary fat: olive oil for addressing and cooking. Typical cooking: frying.
4. Low intakes of saturated fats (cream, butter, margarine).
5. Frequent fish consumption.
6. Moderate intake of dairy products, mainly as cheese and yogurt.

7. Low intakes of meat and meat products, mainly cured luncheon meat.
8. Moderate consumption of wine during meal.
9. High consumption of garlic, parsley, onion, basil, oregano, curcuma, anis, sesame, cinnamon, and other species.

The Mediterranean diet is part of lifestyle that considers the use of traditional ingredients as a characteristic way for meal preparation and cooking. Due to the availability of alimentary sources, there exist variations in the proportion and components of the traditional Mediterranean diet between Mediterranean countries. However, all have similarities close to this profile. The consideration of the Mediterranean diet as a healthy diet was born after the studies performed in Crete, where a higher life expectancy and smaller incidence of arteriosclerosis, coronary heart disease (CHD), and degenerative diseases were observed compared to those observed in other populations [22–26].

In Table 3 information for evaluating adherence to Mediterranean diet during pregnancy is summarized. The first Mediterranean diet adherence (MDA) score was designed by Trichopoulou et al. [23], although other indices having similar premises were defined later. PREDIMED, a large scale longitudinal epidemiological study has used a MDA score of 14 points [25]. Our group has modified this score for evaluating MDA in gestation, after considering that alcoholic beverages, also with a low-medium alcohol content, are not adequate during pregnancy [27].

## MEDITERRANEAN DIET, A DIETARY WAY FOR DECREASING MALNUTRITION OR SUBNUTRITION DURING GESTATION?

Recent publications suggest that MDA during pregnancy can confer a more adequate growth since the first stage of pregnancy [28]. Timmermans et al. [29] have examined, in 3207 Caucasian pregnant, the relationship between early pregnancy dietary habits and fetal and placental growth. The degree of adherence to a Mediterranean-like diet at <18 weeks of pregnancy was significantly associated with intra-uterine growth, revealing a higher birthweight and placental weight for women with strong MDA. The degree of adherence to the diet was positively associated with plasma folate and serum vitamin B<sub>12</sub> concentrations and showed an inverse relationship with homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein

**TABLE 3** Detailed Criteria Taken into Account in the 13-Point MDA Score

MDA-Score Components <sup>a</sup>	Criteria to Obtain 1 Point <sup>a</sup>
Use of olive oil as main culinary fat	Yes
Olive oil consumed per day including that used for frying, salads, meals away from home, etc.	≥4 table spoons
Servings of vegetables per day (1 serving=200 g). Consider side dishes as half a serving	≥2; ≥1 raw or as salad
Units of fruits, including natural fruit juices, per day	≥3
Serving of red meat, hamburger, or meat products (ham, sausage, etc.) per day	<1
Servings of butter, margarine or cream consumed per day (1 serving=12 g)	<1
Sweet or carbonated beverage number per day	<1
Servings of legumes per week (1 serving=150 g)	≥3
Servings of fish or shellfish consumed per week (1 serving=100–150 g of fish or 4–5 units or 200 g of shellfish)	≥3
Servings of commercial (not home-made) sweets or pastries such as cakes, cookies, biscuits, or custards per week	<3
Servings of nuts (including peanuts) per week (1 serving=30 g)	≥3
Consumption of chicken, turkey, or rabbit meat instead of veal, pork, hamburger, or sausage	Yes
Times per week of vegetables, pasta, rice, or dishes seasoned with <i>sofrito</i> , sauce made with tomato, onion, leek, or garlic and simmered with olive oil	≥2

Values correspond to food edible part.

<sup>a</sup>This MDA is an adaptation of the 14-point MDA-score of Salas et al. [25] as red wine consumption should be avoided by all future mothers.

Source: Gesteiro et al. [27] and Sánchez-Muniz et al. [1] with Permission of European Journal of Clinical Nutrition and Nutrición Hospitalaria

plasma concentrations. Thus, a low MDA in early pregnancy is associated with decreased intra-uterine size and lower placental and birthweight.

Our group found that mothers on higher MDA diets during the first term of gestation and the whole pregnancy gain more weight during pregnancy than their lower MDA diet counterparts but their offspring neonates have similar bodyweights [27].

More recently Chatzi et al. [30] reported controversial results on the effects of Mediterranean-like dietary profiles during pregnancy and their influence on fetal growth. Authors evaluate this impact of MDA in 2461 mother–newborn pairs from the Spanish multi-centre “INMA” study (Atlantic area: INMA-Atlantic; Mediterranean area: INMA-Mediterranean), and 889 pairs from the “RHEA” study in Crete. Women in the Mediterranean area reported higher intakes of cereals, vegetables and fruits while in the INMA-Atlantic of fish. Women with high MDA had a significantly lower risk of delivering small for gestational age (SGA) infants in the INMA-Mediterranean cohort. Higher MDA increased birthweight and birth length only in smoking mothers, suggesting that high MDA counterbalanced the detrimental effect of smoking on birth size. The results of the Chatzi et al. [30] show that MDA is not a homogeneous dietary profile, and several variants exist across European Mediterranean regions.

Although all the previously cited studies clearly suggest potential benefits on fetal growth and development of Mediterranean diets, it has to be pointed up that there was not agreement in selecting cut-off points in the MDA score or in the distribution of selected food groups.

The Mediterranean diet effects on gestation are of main importance as both decreased and increased intra uterus growth have been related to a mild or severe degree of degenerative diseases later in life [1,3,11]. “Programming” is the result of insults of different origin and/or in various critical moments of gestation that originates permanent effects affecting size, structure, physiology and metabolism [3]. These responses that increase the probability of future degenerative diseases in adults are, in summary, consequences of fetal and/or embryonary adaptations, mostly linked to desnutrition during gestation, that will permit the economic supervivance of the future body through the setting of several thrifty mechanisms or process. The term “thrifty phenotype” was coined by Barker in the seventies and his hypothesis [3] is one of the most cited in the scientific literature in relation to the programming of metabolic disease in the adult nowadays. Langley-Evans [31] suggests that this metabolic adaptation is a consequence of a series of changes in placental function, in the number and type of foetal tissue cells throughout the development, and to epigenetic changes modifying gene expression.

## MEDITERRANEAN DIET AND GESTATIONAL DIABETES AND GESTATIONAL GLUCOSE INTOLERANCE

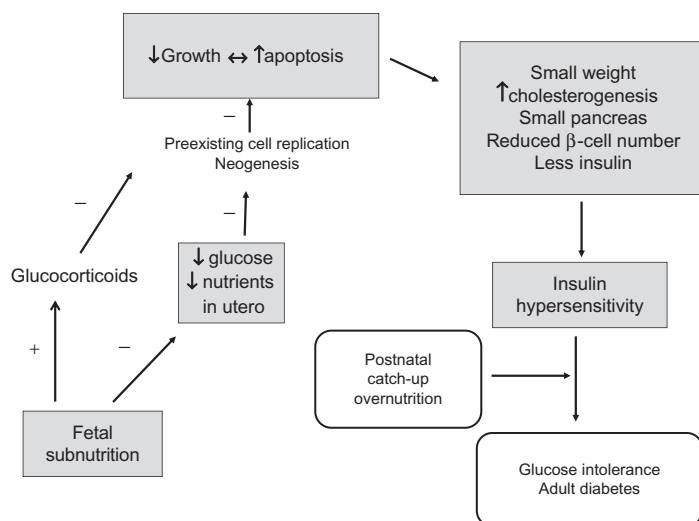
During pregnancy physiological insulin resistance occurs to assure the flux of maternal substrates to the placenta [1,7]. The “new” maternal hormonal profile modifies the insulin sensitivity of peripheral receptors, addressing glucose to the fetus and increasing lipolysis in the mother. Most of the times this is a transitory situation in which the pregnant woman is unable to produce enough insulin or becomes resistant to insulin, thus, glycemia increments occur [9].

Interestingly, Gesteiro et al. [27] found that glucose levels were higher in fasting pregnant women consuming high MDA-score diets than in their low-score counterparts; however, in any case the study women presented basal glycemia values >120 mg/dL. No clear evidence is yet available to explain this, but it can be suggested that a high CHO intake during gestation induces physiologically high maternal glucose levels, permitting adequate fetal glucose uptake. According to MDA scores, adequate or inadequate diets, do not appear to have any effect on the O’Sullivan test or GD, as the prevalence of mothers being positive at the O’Sullivan test was similar in mothers following diets with low MDA than in mothers at adequate MDA diets (30% versus 27%, respectively).

## MATERNAL MEDITERRANEAN DIET AND FETAL/NEONATAL INSULIN SENSITIVITY

Data on the effects of malnutrition on human pancreas development during gestation are very scarce [32]. In rats, the insufficient intra-utero nutrition due to reduced intake or a decrease in the materno–fetal circulation or by placental insufficiency limits the  $\beta$ -cell mass in rodents [1]. Feed intake limitation induces metabolic changes that modify the development of fetal insulin production cells [1]. Islets become smaller, have less  $\beta$ -cells than those whose mothers were fed *ad libitum* (Figure 3).

In the fetal period, inadequate nutrition negatively affect  $\beta$ -cell functionality in man and experimental animals [1]. Sub-nutrition, hypoglycemia, and fatty acid excess, among other factors, diminish the expression of different transcription factors as PDX-1 in  $\beta$ -cells. In addition, insulin-like growth factors (IGF) production is very sensitive to the nutritional state [1]. This situation makes the body less able to respond to non-programmed situations (Figure 3), as we have



**FIGURE 3** Insulin and lipoprotein programming during pregnancy. Fetal subnutrition influencing growth and pancreas capacities. Notice that the glucose and nutrient availability affect glucocorticoid concentrations and the flux of new cells originating lower pancreatic cell growth and less insulin production. This fact is counterbalanced by increasing insulin sensitivity and cholesterolgenesis. High food amount availabilities would induce adaptive mechanisms addressing glucose intolerance, Diabetes mellitus, and/or dyslipaemia and CHD in this “programmed” body later in life. *Modified from Sánchez-Muniz et al. [1].*

commented the number of  $\beta$ -cells is maintained relatively constant after birth. This becomes even more complicated when the level of glucocorticoids in plasma and tissues increases. This is frequently found in malnutrition (Figure 3), negatively affecting growth by reducing the expression of transcription factors and the receptor to IGF-1 concentration [1]. However, the decrease in the production and secretion of insulin due to the  $\beta$ -cell mass reduction is balanced, at least partially, by the insulin sensitivity increase (Figure 3). The insulin hypersensitivity would be a clear advantage in adverse environments (e.g. chronic subnutrition or malnutrition), as peripheral tissues respond more intensively to insulin. However, this situation becomes negative when the limitation or reduction is not present anymore (Figure 3).

Animal studies suggest that the placental lipid transference changes according to lipid concentration in uterus and uterus circulation [9,13,33]. Increments in uterin saturated fatty acids (SFA) decrease insulin sensitivity and raise permanently the glucose/insulin ratio in the offspring suggesting poor glucose utilization. The increase in omega-3 fatty acids is related to insulin sensitivity increases, while a perinatal omega-6 fatty acids excess is related to increasing prevalence of obesity in adult rodents [8,34]. The omega-6/omega-3 ratio also seems to play a role, as offspring whose mothers got a diet with a high omega-6/omega-3 ratio (59:1) weighed more at weaning and had more fat than their low omega-6/omega-3 ratio (2:1) counterparts. Interestingly, adipocytes show higher cell size that were permanently increased during adult life [35].

Our group has been interested in knowing if inadequate dietary habits can affect neonatal glucose metabolism and insulin sensitivity/resistance without significantly affecting fetal growth. We are also interested in the refractivity to change dietary habit and food consumption profiles during gestation. Diet characteristics and particularly the CHO type [36], the glycemic charge and load [37], the SFA contribution [37], the SFA/CHO ratio [38], the omega-3 amount [39] and the omega-6/omega-3 ratio [39] affect insulin sensitivity/resistance in consumers.

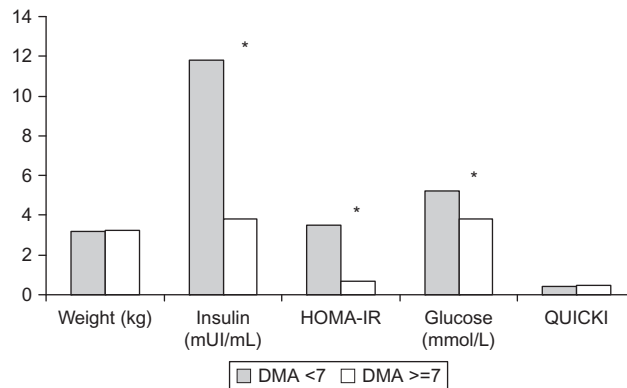
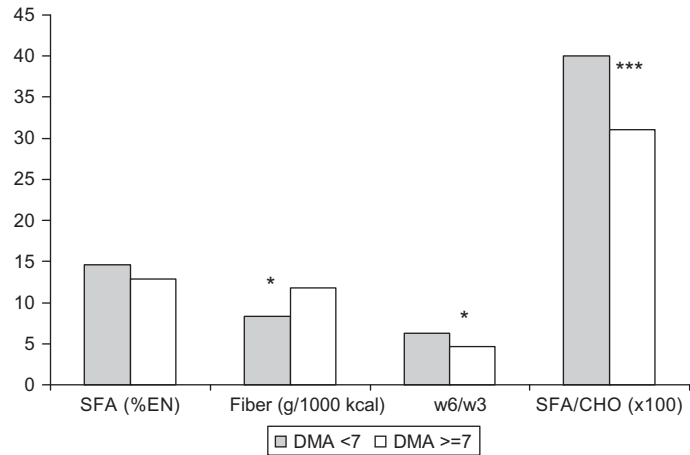
Our group [27] has studied the nutritional habits and MDA in a sample of women during gestation. The MDA was tested according to a modification of the MDA questionnaire used in the PREDIMED study [25].

A detailed analysis of diet showed that the energy contribution of CHO, total fat and fiber was more adequate in mothers presenting MDA score  $\geq 7$ . The SFA/CHO ratio was also increased in the low-MDA score diet (Figure 4) negatively affecting neonatal insulinemia, glycemia and homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) but not body-weight (Figure 5). Our study suggests that, in general terms, the food profile is kept throughout pregnancy [27]. Results are relevant suggesting the importance of adequate nutritional habits during early gestation; thus, incorrect nutrition clearly programs metabolic changes inducing a prediabetic profile at birth.

## PREGNANCY, LIPOPROTEINS, AND OTHER CORONARY HEART DISEASE RISK

Maternal fat depot accumulation takes place during the first half of pregnancy, mainly due to maternal hyperinsulinaemia and enhanced adipose tissue insulin sensitivity [1,7]. During late pregnancy, lipoprotein lipase (LPL) and postheparin LPL activities are decreased [7]. This metabolic situation gives rise to lower fat uptake by maternal adipose tissue, that together with the increases in lipolytic activity of adipose tissue [7], result in an increased breakdown of the fat depot originated during the first term of pregnancy. Free fatty acids and glycerol are respectively converted in the liver into acyl-CoA in

**FIGURE 4** Nutritional characteristics of diets followed by the Mérida study mothers during the gestation first trimester. MDA, Mediterranean diet adherence; SFA, saturated fatty acids; CHO, carbohydrates;  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, omega-6/omega-3 ratio. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Modified from Gesteiro et al. [27] and Sánchez-Muniz et al. [1].



**FIGURE 5** Anthropometric and hormonal characteristics and insulin sensitivity/resistance markers of Mérida study neonates whose mother followed adequate or non-adequate diets during the gestation first trimester. MDA, Mediterranean diet adherence; HOMA-IR, homeostatic model assessment-insulin resistance; QUICKI, quantitative insulin sensitivity check index. \* $p < 0.05$ . Modified from Gesteiro et al. [27] and Sánchez-Muniz et al. [1].

glycerol-3-phosphate originating triglycerides which are packed into VLDL. The insulin-resistance in late gestation contributes to both increased fat lipolysis and VLDL production and secretion [7].

These metabolic fates occurring at late pregnancy condition the increase of VLDL levels and, thus, of VLDL-triglycerides and triglycerides [7,40]. In some pregnant women the plasma cholesterol is also increased at the end of gestation, mainly due to cholesterol is also being carried by VLDL.

Thus, the increased number of VLDL particles during late gestation explains the raise in cholesterol although other metabolic modifications would be at work. It can also be suggested that during gestation dietary mechanisms to control low density lipoproteins (LDL) must have less significance than at the pre-gestational stage; thus, pregnancy cholesterolemia should have poor diagnostic value, as increased plasma cholesterol seems to be consequence of the transitory metabolic situation generated during gestation. In fact we have observed (unpublished data) that the cholesterolemia of pregnant women consuming the low versus high MDA- and low versus high healthy eating index-score diets did not significantly differ. It is possible that some food components increase the insulin resistance to abnormal values giving rise to GD but future investigations are demanded.

The detection of high total cholesterol (TC), apolipoprotein (Apo) B, and the low Apo A1, Apo A1/Apo B ratio in umbilical cord blood from term newborns could identify neonates at high risk for cardiovascular disease (CVD) [41]. Our group has shown that the level of some CVD risk markers (e.g. TC, TC/cholesterol transported by high density lipoproteins (HDL) (TC/HDL-c), Apo A1/Apo B) at age 4 can be predicted considering these factors at birth and those of their respective parents [42].

Delivery represents significant stress to both mother and child. The dramatic decrease of fetal antioxidant capacity at the end of labor may induce lipoprotein oxidation increase. However, few studies have defined normality ranges for oxidized LDL (oxLDL) in full-term neonates. The Palinski and Napoli hypothesis [4] suggests that hypercholesterolemia during

pregnancy can have deleterious effects on the offspring. They observed that the degree and magnitude of atheroma in rabbits, was not only related to maternal and fetal cholesterol but also to the levels of some lipoprotein markers oxidation [4]. Following the studies in animals, these authors performed the FELIC study in humans where normocholesterolemic children of 13 years belonging to normocholesterolemic or hypercholesterolemic mothers at gestation were tested for atheromatous plaques [43]. The comparative analysis on time showed clear differences between both child groups; the atheromatous profile tendency being higher in the hypercholesterolemic mother offspring.

Interestingly, our group has found that a relatively high percentage of term-neonates display at birth a concurrence of dysglycaemia and dyslipidemia and these neonates showed increased insulin resistance [44].

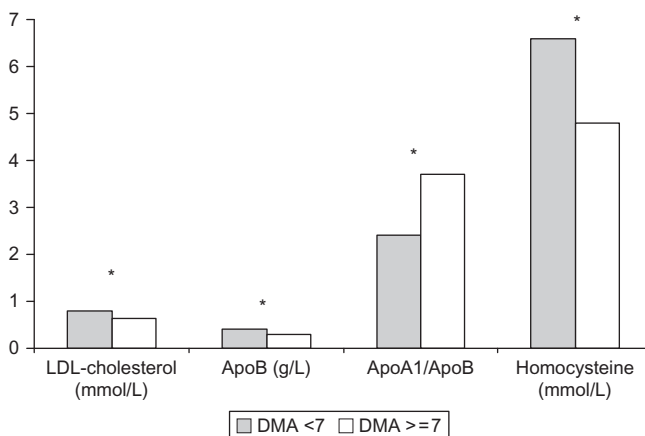
In gestation, fetal endogenous cholesterol production is enhanced to assure cholesterol transfer to endocrine and other organs. Unfortunately, the effects of diet on lipoproteins in the fetus and at birth have been scarcely studied. To the best of our knowledge, the scarcity could be related to the fact that the average cholesterol level in different neonate populations is similar. However, detailed studies suggest differences due to inheritance, such as hypercholesterolemia at birth, are more frequent when parents are hypercholesterolemic [41,42].

The lipoprotein profile of SGA differs from that of appropriate for gestational age [45] as SGA neonates present higher cholesterol levels. We are far from knowing all metabolic facts engaged but the higher cholesterolemia observed in SGA would be a counterbalancing effect for assuring growth and maturation in SGA. Thus, this programmed situation could be deleterious when thrifty individuals consume diets rich in cholesterol and SFA. In a follow-up study performed in Japan during 20 years it has been demonstrated that a reduced body weight at birth was associated to increased values of blood pressure and cholesterol levels in males and females [46]. In the Västerbotten Intervention Program, weight reduction at birth was associated to 7-fold higher risk of hypertension (systolic blood pressure >160 mmHg) and higher values of cholesterol in males and of triglycerides in females [47]. Different meta-analyses have shown the existence of an inverse relationship between bodyweight at birth and cholesterol levels. Owen et al. [48] analyzed 28 studies and observed a reduction of 0.048 mmol/L per kg of bodyweight increase. Other meta-analysis done in 58 studies, the correlation implies decreasing cholesterol 1.39 mg/dL per kg body weight [49].

## MATERNAL MEDITERRANEAN DIET AND NEONATAL LIPOPROTEIN PROFILE

Although information is vast on the protective effects of a Mediterranean diet on several aspects [22–26], the information of the CHD benefits of this diet during pregnancy is scarce and, unfortunately, very few human studies are available. In animal research, olive oil is usually employed as control fat, thus control lipid and lipoprotein values during pregnancy are partially due to the olive oil consumption. However, semisynthetic diets also contain other compounds that clearly affect lipids and lipoproteins (e.g. protein, fiber, CHO, minerals, vitamins, both type and absolute amounts). The Mediterranean diet followed during gestation decreases homocysteine levels in Brazilian neonates whose mothers consumed Mediterranean-like diets [50].

Our group (unpublished data) has found that adequate MDA during the first term of pregnancy induces lipoprotein profile improvement. Also the level of homocysteine decreased. This situation would probably be dependent on the improvement of glucose metabolism and higher body weight gain of those mothers (Figure 6).



**FIGURE 6** CHD risk markers of Mérida study neonates whose mothers followed adequate or non-adequate diets during the gestation first trimester. MDA, Mediterranean diet adherence; \* $p < 0.05$  (unpublished data).



Considering again the Napoli and Palinski [4] hypothesis and the results of the FELIC study [44], it can be suggested that any way of decreasing cholesterol and increasing antioxidant status would be beneficial with respect to CHD. In fact, Napoli and Palinski [4] show that, at similar plasma cholesterol values, an increase in the antioxidant intake counterbalances the negative effects of the increased cholesterolemia to a level similar to those of normocholesterolemic mothers. However, specific, long-term, and well designed studies are needed for testing this Mediterranean diet effect hypothesis.

## FUTURE REMARKS

Recent studies suggest that diets with a dysbalanced macronutrient energy contribution negatively affect the insulin resistance of neonates, inducing a pre-diabetic profile at birth or at the fetal stage. As present diets in developed countries are poor in CHO, rich in SFA, and have increased omega-6/omega-3 ratios, more studies should be performed to understand when the negative influence of these diets during gestation is crucial.

As Mediterranean diet is rich in antioxidants, it is expected, according to the Palinski and Napoli hypothesis [4] and the FELIC study [43], to find future lower incidence and severity of atheromas in the children whose mothers had adequate-MDA during pregnancy than in their low-MDA counterparts. This hypothesis will be tested in the future.

The interaction between Mediterranean diet adequacy and specific candidate gene polymorphisms in mothers and their offsprings should be done to understand the mechanisms relating Mediterranean diet, embryonary and fetal stages, and health later in life.

## SUMMARY POINTS

- Maternal diet affects growth, maturation, and fetal development.
- When malnutrition/severe hyponutrition exist, body gain reduction is induced depending on its duration, with important effects on pancreas size and activity.
- Metabolic adaptations to reduced intakes induce changes that increase insulin sensitivity and make individuals more efficient in a limited environment. This adaptation, due to the permanent programming, becomes a “Danger” when abundant energy/nutrients are available.
- Adequate MDA during pregnancy can confer a more adequate growth since the first stage of pregnancy.
- First trimester mothers’ diets with adequate adherence to Mediterranean diet present a more adequate energy diet with a higher energy contribution of CHO and lower of total fat, more fiber and lower SFA/CHO ratios than low adherence to Mediterranean diet.
- Adequate adherence to Mediterranean diet since the first trimester of gestation positively affects neonatal insulinemia, glycemia and HOMA-IR.
- Adequate MDA during the first term of pregnancy induces lipoprotein profile improvement. Also the level of homocysteine decreased.

## CONFLICTS OF INTEREST

Authors declare that there are no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

To mothers and neonates of the Mérida Study. We acknowledge the help and assessment of the Laboratory, Obstetrician and Gynecology Services from Mérida Hospital, Mérida, Badajoz, Spain.

## REFERENCES

- [1] Sánchez-Muniz FJ, Gesterio E, Espárrago Rodilla M, Rodríguez-Bernal B, Bastida S. Maternal nutrition during pregnancy conditions the fetal pancreas development, hormonal status and diabetes mellitus and metabolic síndrome biomarkers at birth. *Nutr Hosp* 2013;28:250–74.
- [2] Pascual-Leone AM, Medina JM. Desarrollo perinatal: Origen de patologías adultas. Monografía XXIII. Madrid: Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia; 2008.
- [3] Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171–4.
- [4] Palinski W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J* 2002;16:1348–60.
- [5] Moore KL, Persaud TVN. In: Moore KL, editor. *The developing human: clinically oriented embryology*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2003.

- [6] Thompson JL, Manore MM, Vaughan LA. La nutrición en el ciclo vital: embarazo primer año de vida. In: Thompson JL, Manore MM, Vaughan LA, editors. *Nutrición*. San Francisco, CA: Pearson Education SA; 2008. p. 716.
- [7] Herrera E, López-Soldado I, Limones M, Amusquivar E, Ramos MP. Lipid metabolism during the prenatal phase, and its implications on postnatal development. *Int J Vitamin Nutr Res* 2006;76:216–24.
- [8] Mataix JM, Aranda Ramírez P. Gestación en nutrición y alimentación humana. In: Mataix Verdú J, editor. *Nutrición y alimentación humana. Situaciones fisiológicas y patológicas*. 2nd ed. Majadahonda, Madrid: Ergón; 2009. p. 1061–84.
- [9] American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus (position statement). *Diabetes Care* 2004;27(Suppl. 1):S88–90.
- [10] Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:894–903.
- [11] Serrano-Rios M, Reviriego J, Gutiérrez-Fuentes JA. Classification of diabetes mellitus: criteria for diagnosis. In: Serrano-Rios M, Gutiérrez-Fuentes JA, editors. *Type 2 diabetes mellitus*. Barcelona: Elsevier; 2010. p. 1–23.
- [12] O'Sullivan BA, Henderson ST, Davis JM. Gestational diabetes. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 1998;38:364–71, quiz 372–373.
- [13] Zorzano Olarte A. Utilización de glucosa durante la vida fetal y su regulación nutricional. In: Pascual-Leone AM, Medina JM, editors. *Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas*. Monografía XXIII, Madrid: Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia; 2008. p. 267–301.
- [14] Gil-Sánchez A, Koletzko B, Larqué E. Current understanding of placental fatty acid transport. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012;15:265–72.
- [15] Magnusson-Olsson AL, Hamark B, Ericsson A. Gestational and hormonal regulation of human placental lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 2006;47:2551–61.
- [16] Christesen HT, Falkenberg T, Lamont RF, Jørgensen JS. The impact of vitamin D on pregnancy: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012;91:1368–80.
- [17] Gil A. Third Jesús Culebras lecture—molecular biology and clinical nutrition; where do we stand and where do we go? *Nutr Hosp* 2013;28:241–9.
- [18] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Nutrition during pregnancy, Parts I and II*. Washington, DC: National Academic Press; 1990.
- [19] Larqué E, Gil-Sánchez A, Prieto-Sánchez MT, Koletko B. Omega 3 fatty acids, gestation and pregnancy outcomes. *Br J Nutr* 2012;107:S77–84.
- [20] Sociedad Española de Nutrición (SEN), Departamento de Nutrición. *Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población Española [reviewed in 2008]*. In: Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C, editors. *Tablas de Composición de Alimentos*. Madrid: Pirámide; 2008.
- [21] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements*. Washington, DC: National Academic Press; 2006.
- [22] Sánchez-Muniz FJ. Aceite de oliva, clave de vida en la cuenca Mediterránea. *An R Acad Nac Farm* 2007;73:653–92.
- [23] Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348:2599–608.
- [24] Verschuren WM, Jacobs DR, Bloemberg BP, Kromhout D, Menotti A, Aravanis C, et al. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of Seven Countries Study. *J Am Med Assoc* 1995;274:131–6.
- [25] Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MA, Ibarrola-Jurado N, Basora J, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care* 2011;34:14–9.
- [26] Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279–90.
- [27] Gesteiro E, Rodríguez-Bernal B, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Maternal diets with low healthy eating index or Mediterranean diet adherence scores are associated with high cord-blood insulin levels and insulin resistance markers at birth. *Eur J Clin Nutr* 2012;66:1008–15.
- [28] Meltzer HM, Brantsæter AL, Nilsen RM, Magnus P, Alexander J, Haugen M. Effect of dietary factors in pregnancy on risk of pregnancy complications: results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2011;94(Suppl.):1970S–4S.
- [29] Timmermans S, Steegers-Theunissen RP, Vujkovic M, den Breeijen H, Russcher H, Lindemans J, et al. The Mediterranean diet and fetal size parameters: the Generation R Study. *Br J Nutr* 2012;108:1399–409.
- [30] Chatzi L, Mendez M, Garcia R, Roumeliotaki T, Ibarluzea J, Tardón A, et al. Mediterranean diet adherence during pregnancy and fetal growth: INMA (Spain) and RHEA (Greece) mother–child cohort studies. *Br J Nutr* 2012;107:135–45.
- [31] Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2006;65:97–105.
- [32] Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* 2010;53:2167–76.
- [33] Herrera E, Lasunción MA. Maternal–fetal transfer of lipid metabolites. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, editors. *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia, PA: Saunders; 2004. p. 2855–65.
- [34] Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA. A high-fat diet during pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R127–33.
- [35] Ailhaud G, Guesnet P. Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity; a short review and an opinion. *Obes Rev* 2004;5:21–6.
- [36] Burger KNJ, Beulens JWW, Boer JMA, Spijkerman AMW, van der ADL. Dietary glycemic load and glycemic index and risk of coronary heart disease and stroke in Dutch men and women: the EPIC-MORGEN study. *PLoS One* 2011;6(10):e25955.
- [37] López S, Bermúdez B, Pacheco YM, Villar J, Abia R, Muriana FJG. Distinctive postprandial modulation of  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2008;88:638–44.
- [38] Smith CE, Arnett DK, Corella D, Tsai MY, Lai CQ, Parnell LD, et al. Perilipin polymorphism interacts with saturated fat and carbohydrates to modulate insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:449–55.
- [39] de Santa M, Olalla L, Sánchez-Muniz FJ, Vaquero MP. *N*–3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. *Nutr Hosp* 2009;24:203–17.



- [40] Knopp RH, Bonet B, Lasunción MA, Montelongo A, Herrera E. Lipoprotein metabolism in pregnancy. In: Herrera E, Knopp RH, editors. Perinatal biochemistry. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992. p. 19–51.
- [41] Aasvee K, Kurvinen E, Jordania R, Jauhiainen M, Sundvall J. Lipoprotein parameters in relation to other risk factors of atherosclerosis in adults and newborns: Tallinn Young Family Study. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:245–53.
- [42] Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Cuenca R, Aragonés A, Bravo C. Lipid and lipoprotein concentrations at age 4. Association with neonatal and parental levels. *Med Clin (Barc)* 2007;128:521–8.
- [43] Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D’Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 1999;354:1234–41.
- [44] Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Cord blood lipoproteins, homocysteine, insulin sensitivity/resistance marker profile, and concurrence of dysglycaemia and dyslipaemia in full-term neonates of the Mérida study. *Eur J Ped* 2013;172:883–94.
- [45] Pac-Kozuchowska E. The concentration of lipids, lipoproteins and apolipoproteins in cord blood serum of newborns in the course of intrauterine period. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 2003;58:25–32.
- [46] Miura K, Nakagawa H, Tabata M, Morikawa Y, Nishijo M, Kagamimori S. Birth weight, childhood growth, and cardiovascular risk factors in Japanese aged 20 years. *Am J Epidemiol* 2001;153:783–9.
- [47] Mogren I, Högberg U, Stegmayr B, Lindahl B, Stenlund H. Fetal exposure, heredity and risk indicators for cardiovascular disease in a Swedish welfare cohort. *Int J Epidemiol* 2001;30:853–62.
- [48] Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Birth weight and blood cholesterol levels: a study in adolescents and systematic review. *Pediatrics* 2003;111(5 Pt 1):1081–9.
- [49] Laurén L, Järvelin MR, Elliott P, Sovio U, Spellman A, McCarthy M, et al. EURO-BLCS Study Group. Relationship between birth weight and blood lipid concentrations in later life: evidence from the existing literature. *Int J Epidemiol* 2003;32:862–76.
- [50] Couto FD, Moreira LM, Dos Santos DB, Reis MG, Gonçalves MS. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:382–6.

**PUBLICACIÓN 3**

Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ.

Marcadores de resistencia a la insulina en neonatos normopeso a término. La Cohorte de Mérida

**European Journal of Pediatrics** 2009; 168: 281-288.

ISI Web. JCR. (2008). Índice de impacto: 1.416 (41 de 86 de Pediatrics)

---

**Resumen**

En el desarrollo del síndrome metabólico están implicados multitud de reguladores endocrinos. El objetivo de nuestro trabajo fue establecer intervalos de normalidad para glucosa, hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), cortisol, insulina, el todavía sin publicar índice cuantitativo de comprobación de sensibilidad a la insulina (*quantitative insulin sensitivity check index*; QUICKI) para neonatos, y algunas ecuaciones relacionadas con el establecimiento de modelo homeostático (*homeostatic model assessment*; HOMA), que se han propuesto como indicadores de resistencia (HOMA-R) y sensibilidad (HOMA-S) a la insulina. El estudio incluía 115 neonatos (54 niños y 61 niñas) caucásicos, nacidos de gestación única, normopeso, sin distrés fetal, de madres participantes en la Cohorte de Mérida que no vieron alterada su tolerancia a la glucosa según la prueba de O'Sullivan. Los valores de normalidad expresados como la media (intervalo de confianza 95%) fueron: glucosa, 75,3 mg/dL (68,29–82,29); cortisol, 7,4 µg/dL (6,85–7,97); GH, 16,7 ng/mL (14,87–18,60); insulina, 5,5 µUI/mL (4,12–6,88); IGF-1, 55,2 ng/mL (50,82–59,53); QUICKI, 0,45 (0,43–0,48); HOMA-R, 1,36 (0,84–1,88); HOMA-S, 4,07 (2,66–5,49); el cociente glucosa/insulina, 33,6 (24,58–42,67) y el cociente insulina/cortisol, 0,8 (0,61–1,05). Los intervalos de normalidad de las hormonas (salvo para el cortisol, que tenía valores inferiores), fueron equivalentes a los mostrados en otros estudios. Los valores de cortisol no se pueden asociar con el tipo de parto, ya que sólo 3 nacimientos (2,6%) fueron por cesárea, mientras que 20 fueron partos instrumentales (17,4). Los neonatos del cuartil más bajo para el cociente insulina/cortisol tuvieron valores de QUICKI y HOMA-S mayores ( $P < 0,001$ ) y valores de HOMA-R más bajos ( $P < 0,01$ ). El resultado de nuestro estudio indican los valores de normalidad para sensibilidad y resistencia a la insulina al nacimiento. El cociente insulina/cortisol al nacimiento aparece como un buen indicador precoz de resistencia a la insulina.

**Palabras clave:** HOMA. QUICKI. Síndrome metabólico. Marcadores. Neonatos.

Fe de erratas: En el apartado Materials and Methods, donde pone "BD Vacutainer SSTII tubes with separation gel reference number 8019381 (Becton Dickinson, Plymouth, UK) deber poner: BD Vacutainer SSTII tubes with separation gel reference number 367953 (Becton Dickinson, Plymouth, UK).



# Insulin resistance markers in term, normoweight neonates. The Mérida cohort

Eva Gesteiro · Sara Bastida ·  
Francisco J. Sánchez-Muniz

Received: 1 February 2008 / Accepted: 22 April 2008 / Published online: 3 July 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Several endocrine regulators are implicated in the development of metabolic syndrome. The aim of our study was to assess normal ranges for glucose, growth hormone (GH), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), cortisol, insulin and the yet-to-be-published quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI) for newborns and a number of homeostatic model assessment (HOMA)-related equations that have been proposed as indicators of insulin sensitivity (HOMA-S) and insulin resistance (HOMA-R). The study included 115 (54 males, 61 females) singleton, normoweight, Spanish Caucasian neonates delivered without foetal distress from mothers of the Mérida (Spain) Birth Cohort who tested negative in the O'Sullivan screen. Neonatal normal values given as the mean (95% confidence interval) were: glucose, 75.3 mg/dL (68.29–82.29); cortisol, 7.4 µg/dL (6.85–7.97); GH, 16.7 ng/mL (14.87–18.60); insulin, 5.5 µUI/mL (4.12–6.88), IGF-155.2 ng/mL (50.82–59.53); QUICKI, 0.45 (0.43–0.48); HOMA-R, 1.36 (0.84–1.88); HOMA-S, 4.07 (2.66–5.49), the glucose/insulin ratio, 33.6 (24.58–42.67); the insulin/cortisol ratio, 0.8 (0.61–1.05). Hormone ranges (except for cortisol, whose values were lower) were equivalent to those of other studies.

Cortisolaemia values cannot be associated with the type of delivery, as only three births (2.6%) were by caesarean section, while 20 (17.4%) were instrumental deliveries. Neonates from the lowest quartile of the insulin/cortisol ratio presented higher ( $p<0.001$ ) HOMA-S and QUICKI and lower ( $p<0.01$ ) HOMA-R values. The results of our study indicate normal ranges for insulin resistance and sensitivity at birth. The insulin/cortisol ratio at birth appears to be a good early indicator of insulin resistance.

**Keywords** HOMA · Markers · Metabolic syndrome · Neonates · QUICKI

## Abbreviations

BMI	body mass index
HOMA	homeostatic model assessment
PI	ponderal index
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

## Introduction

Insulin sensitivity is usually described as the ability of insulin to lower plasma glucose levels, which it does by suppressing hepatic glucose production and stimulating glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue. Insulin resistance describes an impaired biological response to insulin [1]. The need for a flexible interpretation of insulin resistance is emphasized by evidence that insulin resistance affects different tissues and actions of insulin to varying degrees [32]. Insulin fasting levels above 15 µUI/mL have been considered to be a marker for hyperinsulinaemia, and thus for insulin resistance [31]. Tests have shown that alterations in insulin/receptor kinetics affect neonates with intrauterine growth restriction (IUGR),

E. Gesteiro  
Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Mérida,  
Polígono Nueva Ciudad s/n,  
06800 Mérida, Badajoz, Spain

S. Bastida · F. J. Sánchez-Muniz (✉)  
Departamento de Nutrición, Facultad de Farmacia,  
Universidad Complutense de Madrid,  
Plaza Ramón y Cajal s/n,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: frasan@farm.ucm.es

**PUBLICACIÓN 4**

Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ.

Lipoproteínas, homocisteína, perfil de marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina y concurrencia de disglucemia y dislipemia en sangre de cordón de neonatos a término del Estudio Mérida.

**European Journal of Pediatrics** 2013; 172: 883-894.

ISI Web.JCR. (2013). Índice de impacto: 1.983 (35 de 117 de Pediatrics)

---

**Resumen**

Las alteraciones tempranas en la homeostasis de la glucosa aumentan el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina y obesidad a lo largo de la vida. La concurrencia al nacimiento de marcadores lipídicos y de sensibilidad/resistencia a la insulina está muy poco estudiada. Este trabajo tenía como objetivo establecer los valores de normalidad para homocisteína (tHcyt), arilesterasa (AE), lípidos, lipoproteínas, y marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina en niños nacidos a término, y determinar el efecto de la concurrencia de disglucemia y dislipemia sobre estos parámetros al nacimiento. Participaron 197 neonatos del Estudio Mérida, todos ellos normopeso (entre 2,5 y <4,0 kg), nacidos a término y sin distrés fetal. Se establecieron percentiles para los parámetros en la población total, y según el sexo de los niños. Se estudió el efecto de la concurrencia de glucosa elevada/triglicéridos elevados (glucosa alta/TG altos) ó glucosa elevada/colesterol transportado por HDL (glucosa alta/HDLc bajo) sobre parámetros como tHcyt, LDLc, HDLc, lipoproteína (a) (Lp(a)), LDL oxidadas (LDLox), AE, glucosa, e índices de sensibilidad (QUICKI) y resistencia (HOMA-IR) a la insulina. Las niñas tenían el colesterol total (TC), HDL-c, Apo A1, Lp(a) y HDL-c/Apo A1 más altos que los niños, pero el transporte relativo de transporte de colesterol por parte de las lipoproteínas de muy baja densidad era menor. No hubo diferencias en cuanto al sexo para glucosa, HOMA-IR y QUICKI. Los neonatos con peso entre 2,5 y 2,999 kg tenían valores más adecuados de HOMA-IR y QUICKI que los niños con peso por encima de los 3 kg. La concurrencia de glucosa alta/TG altos ó glucosa alta/HDLc bajo aumentó el cociente TC/HDLc y el HOMA-IR, pero disminuyó LDLox, LDLox/LDLc y QUICKI respecto de los niños con glucosa baja/TG bajos ó glucosa baja/HDLc alto. La concurrencia glucosa/TG tiene valor predictivo para QUICKI bajo, mientras que la concurrencia de glucosa/HDLc lo tiene para QUICKI bajo y HOMA-IR alto, sugiriendo la importancia que tendría determinar TG, HDLc y glucosa al nacimiento para hacer un cribado de los neonatos candidatos a insulinoresistencia.

Palabras clave: Neonatos. Homocisteína. Lipoproteínas. Concurrencia de factores riesgo. Marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina.



# Cord-blood lipoproteins, homocysteine, insulin sensitivity/resistance marker profile, and concurrence of dysglycaemia and dyslipaemia in full-term neonates of the Mérida Study

Eva Gesteiro · Sara Bastida · Francisco J. Sánchez-Muniz

Received: 23 October 2012 / Accepted: 22 January 2013 / Published online: 15 February 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Early alterations in glucose homeostasis increase the risk of developing insulin resistance and obesity later in life. The concurrence of altered lipids and insulin sensitivity/resistance markers at birth has been scarcely investigated. The study aimed to ascertain level ranges of homocysteine (tHcyt), arylesterase (AE), lipids/lipoproteins, and insulin resistance/sensitivity markers in full-term neonates and to determine the concurrence effect of dyslipaemia and dysglycaemia on those parameters at birth. Participants were 197 full-term, 2.5 to <4.0 kg, without foetal distress Spanish newborns from the Mérida Study. Parameter percentiles for males and females were stated. The effect of the concurrence high glucose/high triglycerides (high glucose/high TG) or high glucose/low cholesterol transported by HDL (HDL-c) on tHcyt, LDL-c, HDL-c, lipoprotein (a) (Lp(a)), oxidised LDL (oxLDL), AE, glucose, insulin sensitivity (QUICKI) and insulin resistance index (HOMA-IR) was studied. Females had higher total cholesterol (TC), HDL-c, Apo A1, Lp(a) and HDL-c/Apo A1, but lower relative transport of TC (%TC) by the very low lipoprotein fraction than males. No gender differences were found for glucose, HOMA-IR and QUICKI. Neonates at the 2.5- to 2.999-kg range display more adequate HOMA-IR and QUICKI levels than their >3.0 kg counterparts. The concurrence of high glucose/high TG or high glucose/low HDL-c increased TC/HDL-c and HOMA-IR, but decreased, oxLDL, oxLDL/LDL-c and QUICKI with respect to that of low glucose/low TG or glucose/high HDL-c. The concurrence glucose/TG has predictive value for low

QUICKI, whilst that of glucose/HDL-c for low QUICKI and high HOMA-IR, suggesting the importance of routine TG, HDL-c and glucose screening at birth as it would identify candidates for insulin resistance.

**Keywords** Neonates · Homocysteine · Lipoproteins · Insulin sensitivity/resistance markers · Concurrence of risk factors

## Abbreviations

AE	Arylesterase
Apo	Apolipoproteins
AUC	Area under the curve
BMI	Body mass index
CVD	Cardiovascular disease
DM	Diabetes mellitus
DMT2	Type 2 diabetes mellitus
HDL-c	Cholesterol transported by HDL
HOMA-IR	Homeostatic model assessment—insulin resistance
tHcyt	Total homocysteine
LDL-c	Cholesterol transported by LDL
Lp(a)	Lipoprotein (a)
MS	Metabolic syndrome
oxLDL	Oxidised LDL
PON1	Paraoxonase-1
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
TC	Total cholesterol
TG	Triglycerides
VLDL	Very low-density lipoproteins
%TC	Relative transport of TC

E. Gesteiro  
Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Mérida, Mérida,  
Badajoz, Spain

S. Bastida · F. J. Sánchez-Muniz (✉)  
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición),  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,  
E-28040-Madrid, Spain  
e-mail: frasan@ucm.es

## Introduction

The perinatal period is very sensitive to several disorders which can increase the risk of metabolic diseases later in life

**PUBLICACIÓN 5**

Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ.

Efectos de la tolerancia materna a la glucosa, la calidad de la dieta durante el embarazo y la insulinemia neonatal sobre biomarcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina en neonatos normopeso.

**Nutrición Hospitalaria** 2011; 26: 1447-1455.

ISI Web. JCR. (2011). Índice de impacto: 1.120 (57 de 74 en Nutrition and Dietetics)

---

**Resumen**

*Introducción:* Los efectos de la disminución de la tolerancia a la glucosa materna sobre la insulinorresistencia neonatal han sido poco estudiados. La puntuación del Índice de Alimentación Saludable es útil para evaluar la calidad de la dieta en gestantes. *Objetivos:* Estudiar la asociación de insulinemia neonatal y la disminución de la tolerancia a la glucosa materna con la sensibilidad/resistencia a la insulina al nacimiento y con el índice de alimentación saludable materno. *Métodos:* Se estudiaron 176 neonatos, caucásicos, a término, normopeso, de embarazo único y sin distrés fetal, cuyas madres fueron cribadas para disminución de tolerancia a la glucosa en el embarazo. Se calcularon el índice cuantitativo de comprobación de sensibilidad a la insulina (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*; QUICKI) y el establecimiento de modelo homeostático (*Homeostatic Model Assessment*; HOMA-IR). En 29 madres se estudió la dieta consumida durante el tercer mes de gestación y se calculó su respectivo índice de alimentación saludable. *Resultados:* Al aumentar el cuartil de insulina en sangre de cordón, aumentaron glucosa, cociente insulina/cortisol, HOMA-IR ( $P < 0,001$ ) e IGF-1 ( $P < 0,01$ ), y disminuyeron QUICKI, cociente glucosa/insulina (ambos  $P < 0,001$ ) y GH ( $P < 0,05$ ). Los neonatos de madres con disminución de la tolerancia a la glucosa tuvieron mayores niveles de insulina, HOMA-IR ( $P < 0,01$ ) y cociente insulina/cortisol ( $P < 0,05$ ) y menores de GH, QUICKI (ambos  $P < 0,01$ ) y cociente glucosa/insulina ( $P < 0,05$ ) que aquellos cuya madre tenía una tolerancia a la glucosa normal. La insulinemia neonatal influye más en los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina que la disminución de la tolerancia a la glucosa. Las madres de los niños hiperinsulinémicos tuvieron el índice de alimentación saludable más bajo ( $P < 0,05$ ). *Conclusiones:* Un gran porcentaje de neonatos con hiperinsulinemia muestran marcadores de insulinorresistencia alterados. Sus madres ingirieron dietas de baja calidad. Debe considerarse la necesidad del cribado de glucosa e insulina en estos neonatos y el asesoramiento y evaluación nutricional durante el embarazo.

**Palabras clave:** Biomarcadores. Dieta en gestación. HOMA-IR. Neonatos. QUICKI. Insulinorresistencia.

Fe de erratas: En el apartado Materials and Methods, donde pone "BD Vacutainer SSTII tubes with separation gel reference number 8019381 (Becton Dickinson, Plymouth, UK) deber poner: BD Vacutainer SSTII tubes with separation gel reference number 367953 (Becton Dickinson, Plymouth, UK).





Original

# Effects of maternal glucose tolerance, pregnancy diet quality and neonatal insulinemia upon insulin resistance/sensitivity biomarkers in normoweight neonates

E. Gesteiro<sup>1</sup>, S. Bastida<sup>2</sup> and F- J. Sánchez Muniz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital de Mérida. Mérida. Badajoz. <sup>2</sup>Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Spain.

## Abstract

**Introduction:** Differences in neonatal insulin sensitivity/resistance markers due to the maternal impaired glucose tolerance (IGT) have not been tested. The Healthy Eating Index (HEI) score has been employed for evaluating pregnancy diet quality.

**Aims:** To study, the effect of neonatal insulinemia, maternal IGT and diet HEI score upon insulin sensitivity/resistance at birth.

**Methods:** 176 singleton, normoweight, full-term, Caucasian Spanish neonates, delivered without fetal distress whose mothers were screened for gestational IGT were studied. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) and Homeostatic Model Assessment (HOMA-IR) were calculated. Diet followed during the third month of pregnancy was recorded and the respective HEI score calculated in a sample of 29 mothers.

**Results:** As quartile for cord blood insulin levels increased, glucose, the insulin/cortisol ratio and HOMA-IR (all  $p < 0.001$ ) and IGF-I ( $p < 0.01$ ) increased while QUICKI and the glucose/insulin ratio (both  $p < 0.001$ ) and GH ( $p < 0.05$ ) decreased. Neonates from IGT mothers had higher insulin, HOMA-IR (both  $p < 0.01$ ) and insulin/cortisol ratio ( $p < 0.05$ ) and lower GH, QUICKI (both  $p < 0.01$ ) and glucose/insulin ratio ( $p < 0.05$ ) than their normal maternal glucose tolerance (NGT) counterparts. Neonatal insulinemia influences more than IGT on the insulin resistance/sensitivity markers at birth. Mothers of hyperinsulinemic neonates showed lower HEI scores ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** A large percentage of full-term normoweight infants with hyperinsulinemia showed altered insulin resistance markers. Their mothers consumed low quality diets. Screening strategies focused on neonatal glycemia and insulinemia together with maternal nutritional assessment and advice during pregnancy should be considered.

(Nutr Hosp. 2011;26:1447-1455)

DOI:10.3305/nh.2011.26.6.5397

Key words: Biomarkers. HOMA-IR. Newborns. QUICKI. Insulin resistance. Pregnancy diet.

**Correspondence:** Francisco José Sánchez Muniz. Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid. Spain. E-mail: frasan@far.ucm.es

Recibido: 9-V-2011.

1.ª Revisión: 15-VII-2011.

Aceptado: 18-VII-2011.

## EFFECTOS DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y CALIDAD DE LA DIETA MATERNA DURANTE EMBARAZO Y DE LOS NIVELES DE INSULINA AL NACIMIENTO SOBRE BIOMARCADORES DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN NEONATOS NORMOPESO

## Resumen

**Introducción:** Los efectos de la disminución de la tolerancia a la glucosa (DTG) materna sobre la insulinoresistencia neonatal han sido poco estudiados. La puntuación del Índice de Alimentación Saludable (HEI) es útil para evaluar la calidad de la dieta en gestantes.

**Objetivos:** Estudiar la asociación de insulinemia neonatal y DTG materna con la resistencia/sensibilidad a la insulina al nacimiento y con el HEI materno.

**Métodos:** Se estudiaron 176 neonatos españoles, caucásicos, a término, normopeso, de embarazo único y sin distrés fetal, cuyas madres fueron cribadas para DTG en el embarazo. Se calcularon el Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) y el Homeostatic Model Assessment (HOMA-IR). En 29 madres se estudió la dieta consumida durante el tercer mes de gestación y se calculó su respectivo HEI.

**Resultados:** Al aumentar el cuartil de insulina en sangre de cordón, aumentaron glucosa, cociente insulina/cortisol, HOMA-IR ( $p < 0.001$ ) e IGF-I ( $p < 0.01$ ), y disminuyeron QUICKI y cociente glucosa/insulina ( $p < 0.001$ ) y GH ( $p < 0.05$ ). Los neonatos de madres con DTG tuvieron mayores niveles de insulina, HOMA-IR ( $p < 0.01$ ) y cociente insulina/cortisol ( $p < 0.05$ ) y menores de GH, QUICKI ( $p < 0.01$ ) y el cociente glucosa/insulina ( $p < 0.05$ ) que los de madres con tolerancia a la glucosa normal. La insulinemia neonatal influye más en los marcadores de resistencia/sensibilidad a la insulina que la DTG. Las madres de los niños hiperinsulinémicos tuvieron HEI más bajos ( $p < 0.05$ ).

**Conclusiones:** Un gran porcentaje de neonatos con hiperinsulinemia muestran marcadores de insulinoresistencia alterados. Sus madres ingirieron dietas de baja calidad. Debe considerarse la necesidad del cribado de glucosa e insulina en estos neonatos y el asesoramiento y evaluación nutricional durante el embarazo.

(Nutr Hosp. 2011;26:1447-1455)

DOI:10.3305/nh.2011.26.6.5397

Palabras clave: Biomarcadores. Dieta en gestación. HOMA-IR. Neonatos. QUICKI. Insulinoresistencia.

**PUBLICACIÓN 6**

Gesteiro E, Rodríguez-Bernal B, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ.

Las dietas maternas con baja puntuación en el índice de alimentación saludable o en la adherencia a Dieta Mediterránea se asocian con niveles de insulina y marcadores de resistencia a la insulina elevados en sangre de cordón.

**European Journal of Clinical Nutrition** 2012; 66: 1008-1015.

ISI Web. JCR. (2012). Índice de impacto: 2.756 (25 de 76 en Nutrition and Dietetics)

---

**Resumen**

*Antecedentes y Objetivos:* Muy pocos estudios han usado el índice de alimentación saludable (IAS) ó la adherencia a dieta mediterránea (ADM) para evaluar la calidad de la dieta durante el embarazo. El objetivo de este trabajo es determinar la relación entre la calidad de la dieta durante el primer trimestre de embarazo y los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina al nacimiento. *Sujetos y métodos:* Marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina de los hijos de 35 mujeres cuyas dietas fueron adecuadas o inadecuadas según su puntuación en el IAS ( $>70$  ó  $\leq 70$ , respectivamente) o en la ADM ( $\geq 7$  ó  $< 7$ , respectivamente). *Resultados:* Las dietas con baja puntuación en el IAS tuvieron menos (g/1000 Kcal) hidratos de carbono ( $P = 0,027$ ) y fibra ( $P = 0,011$ ), y más grasas ( $P < 0,001$ ) y colesterol ( $P < 0,001$ ), y el porcentaje de contribución de energía total (%En) fue menor en hidratos de carbono ( $P = 0,005$ ), y mayor en grasas ( $P < 0,001$ ) y ácidos grasos saturados (AGS;  $P = 0,002$ ) que aquellas con la puntuación de IAS alta. Las dietas con baja puntuación en ADM tenían menos (g/1000 Kcal), fibra ( $P < 0,001$ ) y más colesterol ( $P < 0,05$ ), tenían menos ácidos grasos poliinsaturados + ácidos grasos monoinsaturados/ AGS (AGP + AGM/AGS;  $P = 0,05$ ) y mayores cocientes AGS/hidratos de carbono ( $P = 0,021$ ) y omega-6/omega-3 ( $P = 0,044$ ) que las dietas con alta puntuación. Las mujeres con dietas de baja puntuación en el IAS ó MDA tenían la glucosa basal más baja ( $P = 0,016$  y  $P = 0,025$ , respectivamente) pero sus hijos tenían la insulina ( $P = 0,048$  y  $P = 0,017$ , respectivamente), el establecimiento de modelo homeostático (*Homeostatic model assesment*; HOMA-IR) ( $P = 0,031$  y  $P = 0,049$ , respectivamente) y la glucosa ( $P = 0,018$  y  $P = 0,048$ , respectivamente) más altos. El riesgo relativo (RR) de insulinemia y glucemia neonatal elevada fue 7,6 ( $P = 0,008$ ) y 6,7 ( $P = 0,017$ ) para los de puntuación baja en IAS frente a los de puntuación alta. Los RR para glucosa elevada y HOMA-IR elevado fueron respectivamente 3,4 ( $P = 0,043$ ) y 3,9 ( $P = 0,016$ ) en los neonatos de puntuación baja para ADM comparados con los de puntuación alta. Estos RR no se afectaron por los potenciales factores confundentes. *Conclusión:* Las dietas maternas con baja puntuación para IAS ó ADM durante el primer trimestre de embarazo afectan negativamente a los marcadores de resistencia a la insulina al nacimiento.

Palabras clave: Embarazo. Neonatos. Índice de alimentación saludable. Adherencia a Dieta Mediterránea. Marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina.



## ORIGINAL ARTICLE

## Maternal diets with low healthy eating index or mediterranean diet adherence scores are associated with high cord-blood insulin levels and insulin resistance markers at birth

E Gesteiro<sup>1</sup>, B Rodríguez Bernal<sup>2</sup>, S Bastida<sup>2</sup> and FJ Sánchez-Muniz<sup>2</sup>

**BACKGROUND/OBJECTIVES:** Few studies have used healthy eating index (HEI) and mediterranean diet adherence (MDA) scores to evaluate the diet quality during pregnancy. To determine the relationship between first trimester diet quality and insulin sensitivity/resistance biomarkers at birth.

**SUBJECTS/METHODS:** Cord-blood insulin sensitivity/resistance biomarkers of the offspring of 35 women whose diets were 'adequate' or 'inadequate' according to their HEI score ( $>70$  or  $\leq 70$ , respectively) and their 13-point MDA score ( $\geq 7$  or  $<7$ , respectively).

**RESULTS:** Low HEI-score diets contained less (g/1000 kcal) carbohydrates (CHO;  $P=0.027$ ) and fibre ( $P=0.011$ ), and more fats ( $P<0.001$ ) and cholesterol ( $P<0.001$ ), and contributed (percentage contribution to total energy (%En)) fewer CHO ( $P=0.005$ ), more fats ( $P=<0.001$ ) and saturated fatty acid (SFA;  $P=0.002$ ) than their high HEI-score counterparts. Low MDA-score diets contained less (g/1000 kcal) fibre ( $P<0.001$ ) and more cholesterol ( $P=0.05$ ), had lower polyunsaturated fatty acids + monounsaturated fatty acid/SFA (PUFA + MUFA/SFA;  $P=0.05$ ) and higher SFA/CHO ( $P=0.021$ ) and  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFA ratios ( $P=0.044$ ) than their respective counterparts. Women consuming the low HEI- or low MDA-score diets had low-fasting glycaemia ( $P=0.016$  or  $P=0.025$ , respectively) but delivered infants with high insulinaemia ( $P=0.048$  or  $P=0.017$ , respectively), homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR;  $P=0.031$  or  $P=0.049$ , respectively) and glycaemia ( $P=0.018$  or  $P=0.048$ , respectively). The relative risk (RR) of high-neonatal glycaemia and insulinaemia were 7.6 ( $P=0.008$ ) and 6.7 ( $P=0.017$ ) for low vs high HEI-score groups. High HOMA-IR and high glucose RR were, respectively, 3.4 ( $P=0.043$ ) and 3.9 ( $P=0.016$ ) in neonates from the  $<7$  MDA- vs  $\geq 7$  MDA-score group. These RRs were not affected by potential confounders.

**CONCLUSION:** Maternal diets with low HEI- or MDA-scores during the first trimester of pregnancy negatively affect insulin resistance markers at birth.

*European Journal of Clinical Nutrition* (2012) **66**, 1008–1015; doi:10.1038/ejcn.2012.92; published online 25 July 2012

**Keywords:** pregnancy; neonates; HEI score; mediterranean diet adherence; insulin sensitivity/resistance markers

## INTRODUCTION

Diet during pregnancy is an important factor that affects maternal, fetal and infant health and wellbeing.<sup>1,2</sup> Food and energy-adjusted nutrient intakes from foods did not change appreciably from the first to the second trimester<sup>3</sup> or from early to late pregnancy.<sup>4</sup>

The quantity and quality of dietary carbohydrates (CHO),<sup>5</sup> dietary fibre<sup>6</sup> and fats affect glucose metabolism and insulin resistance/sensitivity. Individuals with high-fat intake are more likely to develop glucose metabolism disorders than those who consume a low-fat diet.<sup>7–9</sup> In addition,  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) affect insulin sensitivity/resistance and fasting plasma glucose levels in different population groups.<sup>7</sup>

The homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) has been widely used to evaluate the degree of insulin resistance in different populations.<sup>10–12</sup> Our group has published the normal range for insulin resistance/sensitivity biomarkers at birth.<sup>13</sup> HOMA-IR correlates with the saturated fatty acid/CHO

(SFA/CHO) ratio,<sup>14,15</sup> suggesting that dietary quality greatly affects this insulin resistance biomarker. Kastorini *et al.*<sup>16</sup> showed that the adherence to the mediterranean diet adherence (MDA) decreases the metabolic syndrome risk.

The healthy eating index (HEI) and the MDA scores have been largely employed to assess diet quality<sup>17</sup> during pregnancy.<sup>18–20</sup> HEI score reflects the complexity of dietary patterns<sup>18</sup> and its validity has been demonstrated in studies using plasma biomarkers.<sup>21,22</sup> MDA score has been used to assess diet quality and its relationship with degenerative diseases.<sup>17,23</sup> PREDIMED, one large scale epidemiological study, uses the 14-point MDA score.<sup>24,25</sup> To our knowledge, there have been no studies on the possible association between diet quality during pregnancy, based on maternal HEI and MDA scores, and insulin sensitivity/resistance markers at birth.

Author's hypothesis was that an 'adequate' diet (based on its HEI or MDA scores) during the first trimester of pregnancy results in lower values of insulin resistance biomarkers at birth than an 'inadequate' diet.

<sup>1</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Mérida, Badajoz, Spain and <sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. Correspondence: Professor FJ Sánchez-Muniz, Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain.

E-mail: frasan@farm.ucm.es

Received 6 June 2011; revised 18 June 2012; accepted 19 June 2012; published online 25 July 2012

## PUBLICACIÓN 7

Gesteiro E, Bastida B, Rodríguez-Bernal B, Sánchez-Muniz FJ.

Adherencia a Dieta Mediterránea durante el embarazo y concentraciones séricas de lípidos, lipoproteínas y homocisteína al nacimiento.

**European Journal of Nutrition** 2014. On line Noviembre 2014.

ISI Web. JCR. (2013). Índice de impacto: 3.840 (17 de 79 en Nutrition and Dietetics)

---

### Resumen

**Antecedentes:** El consumo de una Dieta Mediterránea se asocia con baja prevalencia de las principales enfermedades degenerativas. Una puntuación baja en la adherencia a Dieta Mediterránea (ADM) se ha relacionado con insulina y establecimiento de modelo homeostático (*Homeostatic model assesment*; HOMA-IR) elevados al nacimiento. Hay poca información sobre la relación entre la ADM materna y el perfil lipoproteico al nacimiento. **Métodos:** Es un estudio transversal centrado en investigar la relación entre la calidad de la dieta en el embarazo y los valores séricos de lípidos, arilesterasa (AE) y homocisteína al nacimiento. Se usó la sangre de cordón de los hijos de 35 madres cuyas dietas en el embarazo se clasificaron como adecuadas o inadecuadas según la puntuación obtenida en el cuestionario de ADM de 13 puntos ( $\geq 7$  ó  $< 7$ , respectivamente). **Resultados:** Las puntuaciones de ADM no cambiaron significativamente a lo largo de la gestación. Las dietas con puntuación baja tuvieron mayor índice aterogénico, y contenían menos fibra, folatos, y tenían un cociente (ácidos grasos poliinsaturados + ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos saturados) (AGP+AGM/AGS) menor, más colesterol y valores mayores para los cocientes AGS/hidratos de carbono y omega-6/omega-3 respecto a las dietas con puntuación alta. Las madres con puntuación baja dieron a luz neonatos con LDLc ( $P = 0,049$ ), Apo B ( $P = 0,040$ ), homocisteína ( $P = 0,026$ ) y el cociente Apo A1/Apo B ( $P = 0,024$ ) elevados. **Conclusión:** Los neonatos cuyas madres consumieron dietas con baja puntuación para ADM presentaron niveles de homocisteína elevados y un perfil lipoproteico alterado al nacimiento. Se necesitan estudios de seguimiento para prevención de enfermedad cardiovascular temprana para entender la importancia de estos hallazgos a lo largo de la vida.

Palabras clave: Arilesterasa. Homocisteína. Lípidos. Lipoproteínas. Adherencia a Dieta Mediterránea. Embarazo. Neonatos.



# Adherence to Mediterranean diet during pregnancy and serum lipid, lipoprotein and homocysteine concentrations at birth

Eva Gesteiro · Sara Bastida · Beatriz Rodríguez Bernal · Francisco J. Sánchez-Muniz

Received: 9 August 2014 / Accepted: 6 November 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

## Abstract

**Background** Mediterranean diet consumption is associated to low prevalence of major degenerative diseases. Low Mediterranean-diet-adherence (MDA) score has been related to high insulin and homeostatic model assessment-insulin resistance levels at birth. The relationship between maternal MDA and offspring lipoprotein profile at birth has been scarcely reported.

**Methods** Cross-sectional study aimed to study the relationship between pregnancy diet quality and serum lipid, arylesterase and homocysteine values at birth. Cord blood of the offspring of 35 women whose diets were classified as “adequate” or “inadequate” according to their 13-point MDA-score ( $\geq 7$  or  $< 7$ , respectively) were studied.

**Results** MDA-scores did not significantly change through pregnancy. Low-MDA-score diets presented a higher atherogenic index, contained less fiber and folates, and had a lower (polyunsaturated + monounsaturated)/saturated fatty acids (PUFA + MUFA/SFA) ratio, more cholesterol, and higher SFA/carbohydrates (SFA/CHO) and  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFA ratios than their respective high-MDA-score counterparts. Mothers at the low MDA-score delivered neonates with high LDL-c ( $P = 0.049$ ), Apo B ( $P = 0.040$ ), homocysteine ( $P = 0.026$ ) and Apo A1/Apo B ratio ( $P = 0.024$ ).

**Conclusions** Neonates whose mothers consumed low MDA diets presented impaired lipoprotein and increased homocysteine levels at birth. A follow-up study on early cardiovascular disease prevention is needed to understand the importance of present findings later in life.

**Keywords** Arylesterase · Homocysteine · Lipids · Lipoproteins · Mediterranean diet adherence · Pregnancy · Neonates

## Abbreviations

AE	Arylesterase
AI	Atherogenic index
Apo	Apolipoprotein
CHO	Carbohydrates
CVD	Cardiovascular disease
FA	Fatty acids
FFQ	Food frequency questionnaire
HDL-c	High-density lipoprotein cholesterol
HOMA-IR	Homeostatic model assessment-insulin resistance
LDL	Low-density lipoproteins
LDL-c	Low-density lipoprotein cholesterol
LDL-R	LDL receptor
MD	Mediterranean diet
MDA	Mediterranean diet adherence
MUFA	Monounsaturated fatty acids
oxLDL	Oxidized LDL
PON-1	Paraoxonase
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
SFA	Saturated fatty acids
TC	Total cholesterol
TG	Triglycerides
tHcys	Total homocysteine
TI	Thrombogenic index

E. Gesteiro  
Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Mérida, Polígono  
Nueva Ciudad s/n, 06800 Mérida, Badajoz, Spain

S. Bastida · B. Rodríguez Bernal · F. J. Sánchez-Muniz (✉)  
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición),  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,  
Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: frasan@ucm.es



## PUBLICACIÓN 8

Gesteiro E, Bastida S, Vázquez-Velasco M, Corella D, Ordovas JM, Sánchez-Muniz FJ.

Efecto del polimorfismo S19W de la APO A5 sobre el crecimiento, sensibilidad a la insulina y lipoproteínas en neonatos normopeso.

**European Journal of Pediatrics.** 2011; 170: 1551-1558.

ISI Web.JCR. (2011). Índice de impacto: 1.879 (39 de 113 de Pediatrics)

### Resumen

La apolipoproteína (Apo) A5 es una lipoproteína implicada en la activación de la lipoprotein lipasa (LPL) y el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG). La LPL juega un papel principal en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG, y se sabe que la actividad LPL de la placenta correlaciona positivamente con los depósitos de grasa en el feto y su tamaño. En este trabajo estudiamos la asociación entre el polimorfismo S19W del gen APOA5 y las medidas antropométricas, concentraciones de lipoproteínas y hormonas, y sensibilidad a la insulina en 58 neonatos caucásicos normopeso de la cohorte de Mérida. Los neonatos portadores del alelo W mostraron menor índice de masa corporal (IMC), índice ponderal (IP) (ambos  $P < 0,001$ ), peso ( $P < 0,01$ ), insulinemia, cociente insulina/cortisol, HOMA-R y concentración de Apo B (todos  $P < 0,05$ ), y mayor concentración de LDL oxidadas (LDLox) e índice LDLox/LDL (ambos  $P < 0,05$ ) que los neonatos homocigotos para el alelo S. Hemos encontrado asociación del polimorfismo S19W del gen APOA5 con el crecimiento fetal, así como con la glucemia y el metabolismo lipoproteico. La concurrencia del polimorfismo S19W en los neonatos y sus madres no afectó las concentraciones de lípidos y lipoproteínas neonatales, pero sí se asoció con alteraciones en el crecimiento. Específicamente, los portadores del alelo W mostraron un grado de oxidación de las LDL mayor, y menor peso, insulinemia, cociente insulina/cortisol, y concentración de Apo B que los homocigotos para el alelo S. En conclusión, estos hallazgos sugieren que los portadores del alelo W recibieron una nutrición menos óptima durante el embarazo y que su estatus antioxidante de lipoproteínas era menor al de los neonatos homocigotos para el alelo S.

**Palabras clave:** Gen APOA5. Polimorfismo S19W. Apo B. Apropriados para su edad gestacional. Peso. HOMA. Marcadores de resistencia a la insulina. Lípidos. Neonatos.

Fe de erratas: En el apartado Materials and Methods, donde pone "BD Vacutainer SSTII tubes with separation gel reference number 8019381 (Becton Dickinson, Plymouth, UK) deber poner: BD Vacutainer SSTII tubes with separation gel reference number 367953 (Becton Dickinson, Plymouth, UK).



# Effects of APOA5 S19W polymorphism on growth, insulin sensitivity and lipoproteins in normoweight neonates

Eva Gesteiro · Sara Bastida · Miguel Vázquez-Velasco ·  
Dolores Corella · Marisa Guillén · Jose M. Ordovas ·  
Francisco J. Sánchez-Muniz

Received: 14 December 2010 / Accepted: 4 April 2011 / Published online: 20 April 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Apolipoprotein (Apo) A5 is a protein involved in the activation of lipoprotein lipase (LPL) and the metabolism of triglyceride (TG)-rich lipoproteins. LPL plays a major role in the metabolism of TG-rich lipoproteins, and placental LPL activity is known to correlate positively with foetal fat deposition and size. We examine the association between the common APOA5 S19W polymorphism and neonatal anthropometrical measurements, lipoprotein and hormone concentrations, and insulin sensitivity in 58 normal weight Caucasian newborns from the Mérida cohort. Neonates with the W allele displayed lower BMI ( $P<0.001$ ), ponderal index ( $P<0.001$ ), birth weight ( $P<0.01$ ), insulin levels ( $P<0.05$ ), the insulin/cortisol ratio ( $P<0.05$ ), HOMA-R ( $P<0.05$ ) and Apo B values ( $P<0.01$ ), but higher oxidised LDL (LDLox) values and a higher LDLox/

low-density lipoprotein (LDL) ratio (both  $P<0.05$ ) than S-homozygous newborns. The APOA5 S19W polymorphism was associated with foetal growth as well as with glucose and lipoprotein metabolism in the neonates. Concurrence of the S19W polymorphism in neonates and their mothers did not affect neonatal lipid and lipoprotein concentrations but was associated with impaired foetal growth. Specifically, W allele carriers displayed a higher degree of LDL oxidation and lower body weight, plasma insulin values, insulin/cortisol ratio and Apo B concentrations than homozygotes for the common S allele. In conclusion, these findings suggest that the W allele carriers received a less optimal nutrition during gestation and that their lipoprotein antioxidant status was inferior to that of their homozygous S allele counterparts.

E. Gesteiro  
Servicio de Análisis Clínicos, Hospital de Mérida,  
Polígono Nueva Ciudad s/n Mérida,  
Badajoz, Spain 06800

E. Gesteiro · S. Bastida · M. Vázquez-Velasco ·  
F. J. Sánchez-Muniz (✉)  
Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición).  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,  
Plaza Ramón y Cajal s/n,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: frasan@farm.ucm.es

D. Corella · M. Guillén  
Departamento de Medicina Preventiva y CIBER Fisiopatología de  
la Obesidad y Nutrición, ISCIII. Facultad de Medicina,  
Universidad de Valencia,  
46010 Valencia, Spain

J. M. Ordovas  
Nutrition and Genomics Laboratory Jean Mayer USDA Human  
Nutrition Research Centre on Aging, TUFT University,  
Boston, MA 02111, USA

**Keywords** Apo A5 gene · S19W polymorphism · Apo B ·  
Appropriate for gestational age · Body weight · HOMA ·  
Insulin resistance markers · Lipids · Newborn

## Abbreviations

AE	Arylesterase
AGA	Appropriate for gestational age
Apo	Apolipoprotein(s)
APOA5	Apo A5 gene
BMI	Body mass index
FABP	Fatty acid binding protein
FFA	Free fatty acids
GH	Growth hormone
HOMA	Homeostatic model assessment
IGF-I	Insulin-like growth factor I
IUGR	Intrauterine growth restriction
LDLox	Oxidised LDL
LPL	Lipoprotein lipase
MS	Metabolic syndrome

**PUBLICACIÓN 9**

Gesteiro E, Sánchez-Muniz FJ. Ortega-Azorín C. Guillén M. Corella D. Bastida S.

El polimorfismo FTO rs9939609 materno y neonatal afecta a los marcadores de sensibilidad a la insulina y al perfil lipoproteico al nacimiento en neonatos apropiados para su edad gestacional.

**Eur J Nutr.** Enviado en Enero 2015. EJON-D-15-0034

---

**Resumen**

La influencia del polimorfismo materno del gen FTO (*fat mass and obesity*) en los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina y perfil lipoproteico neonatales no se ha estudiado. Este trabajo comprueba la asociación entre el polimorfismo FTO rs9939609 en las parejas madre-niño y las medidas antropométricas, sensibilidad a la insulina y concentraciones de lípidos y lipoproteínas al nacimiento. Es un estudio transversal en el que se estudian 53 neonatos caucásicos nacidos a término, apropiados para su edad gestacional, junto con sus madres. El 66% de las madres y los niños eran portadores del alelo A. Las madres homocigotas para el alelo T ganaron menos peso durante el embarazo pero no se encontró ninguna influencia del gen materno sobre el peso neonatal, índice de masa corporal o índice ponderal. Los neonatos de las madres portadoras del alelo A mostraron menor glucemia, insulinemia, y HOMA-R, pero mayor HOMA-S y homocisteína que los neonatos cuyas madres eran homocigotas para el alelo T. Los neonatos portadores del alelo A tuvieron insulina y HOMA-R mayores. La actividad arilesterasa, glucemia, insulinemia y HOMA-R eran mayores en los neonatos portadores del alelo A hijos de madres homocigotas para el alelo T. Las madres portadoras del alelo A mostraron mayor adherencia a la Dieta Mediterránea (ADM) que las homocigotas para el alelo T. La ADM también fue mayor en las madres portadoras del alelo A cuyos hijos también lo eran. Conclusión: Los neonatos portadores del alelo A tenían los marcadores de resistencia a la insulina elevados al nacimiento. Este efecto potencialmente negativo en la homeostasis de la glucosa se vio compensado en los hijos de madres portadoras del alelo A, pero no en los hijos de madres homocigotas para el alelo T, y parece relacionado con la ADM durante el embarazo.

Palabras clave: Neonatos a término. Madres. Gen FTO. Síndrome metabólico. Sensibilidad a la insulina. Lipoproteínas.



# European Journal of Nutrition

## Maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism affect insulin sensitivity markers and lipoprotein profile at birth in appropriate-for-gestational-age term neonates --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism affect insulin sensitivity markers and lipoprotein profile at birth in appropriate-for-gestational-age term neonates
<b>Article Type:</b>	Original Contribution
<b>Keywords:</b>	Appropriate for gestational age; FTO gene; Health eating index; Glucose; Insulin sensitivity; Lipids; Lipoproteins; Mediterranean diet adherence; Mothers; Term neonates
<b>Corresponding Author:</b>	Francisco J Sánchez-Muniz, Ph.D Universidad Complutense. Facultad de Farmacia Madrid, Madrid SPAIN
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidad Complutense. Facultad de Farmacia
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Eva Gesteiro, PhD student
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Eva Gesteiro, PhD student Francisco J Sánchez-Muniz, Ph.D Carolina Ortega-Azorín, PhD Marisa Guillen, PhD Dolores Corella, Senior Professor Sara Bastida, Professor
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background.</b> The influence of maternal Fat Mass and Obesity (FTO) gene polymorphism on neonatal insulin sensitivity/resistance biomarkers and lipoprotein profile has not been tested.</p> <p><b>Methods.</b> Fifty-three term, appropriate-for-gestational-age, Caucasian newborns together with their respective mothers participated in a cross-sectional study. The study aimed to assess the association between the FTO rs9939609 polymorphism in mother-neonate couples and neonatal anthropometrical measurements, insulin sensitivity and lipid and lipoprotein concentrations at birth was studied.</p> <p><b>Results.</b> Sixty-six-percent of mothers and neonates were A-carrier. TT-mothers gained less weight during pregnancy but non-significant maternal gene-influence was found for neonatal bodyweight, BMI or ponderal index. Neonates from A-carrier mothers showed lower glucose, insulin, and HOMA-IR but higher HOMA-IS and homocysteine than neonates whose mothers were TT. A-carrier neonates had higher insulin and HOMA-IR. Glucose, insulin, HOMA-IR, and arylesterase activity were higher in A-carrier neonates whose mothers were T-homozygous. A-carrier mothers had higher Mediterranean-diet-adherence (MDA) than TT ones. MDA was also higher in A-carrier mothers whose neonates were A-carrier.</p> <p><b>Conclusion.</b> A-carrier neonates presented increased insulin resistance markers at birth. This potential negative effect on glucose homeostasis was counterbalanced in neonates delivered by A-carrier mothers but not by TT ones, and seems related to MDA during pregnancy</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	Stefanie Schoppen, PhD

	<p>Bernhard Nocht Institute  schoppen@bni-hamburg.de  She is expert in child nutrition, and cardiovascular disease factors, also in genetics</p>
	<p>Julie Lovegrove  Hugh Sinclair Chair in Human Nutrition , Reading University. Reading UK  j.a.lovegrove@reading.ac.uk  She is expert in nutrition and cardiovascular disease</p>
	<p>Jose M Ordovas, PhD  Senior Professor, Tufts University. Boston  jose.ordovas@tufts.edu  He is expert in genetics, nutrition, nutrigenetics, and cardiovascular disease</p>
	<p>Ascensión Marcos, PhD  Research Professor, ICTAN, CSIC  amarcos@ictan.csic.es  She is expert in epidemiology, nutrition and cardiovascular disease</p>
	<p>Luis Moreno, PhD, MD  Professor, Hospital Clínico de Zaragoza.  lmoreno@unizar.es  He is Pediatrician, Expert in epidemiology and Nutrition</p>
	<p>M Pilar Vaquero, PhD  Research Professor, ICTAN, CSIC  mpvaquero@ictan.csic.es  She is expert in nutrition, glucose homeostasis</p>
	<p>Jordi Salas Salvado, PhD, MD  Universidad de Reus  jordi.salas@urv.cat  He is expert in nutrition, epidemiology, Mediterranean diet</p>

**Maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism affect insulin sensitivity markers and lipoprotein profile at birth in appropriate-for-gestational-age term neonates.**

**Eva Gesteiro<sup>1,2</sup>, Francisco J. Sánchez-Muniz<sup>1\*</sup>, Carolina Ortega-Azorín<sup>3</sup>, Marisa Guillén<sup>3</sup>, Dolores Corella<sup>3</sup>, and Sara Bastida<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid, Spain.*

*<sup>2</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital de Mérida. Polígono Nueva Ciudad s/n 06800-Mérida (Badajoz) Spain.*

*<sup>3</sup>Departamento de Medicina Preventiva y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, ISCIII. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 46010-Valencia, Spain.*

*\*Corresponding author: Professor Francisco J. Sánchez-Muniz. Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain. Phone: 34 91 394 1828; Fax 34 91 3941810; e-mail: frasan@ucm.es*

**Short title:** FTO rs9939609, neonatal insulin and lipoproteins

**Conflict of interest:** None

**Word count from Introduction to References:** 3662



## Abstract:

**Background.** The influence of maternal Fat Mass and Obesity (FTO) gene polymorphism on neonatal insulin sensitivity/resistance biomarkers and lipoprotein profile has not been tested.

**Methods.** Fifty-three term, appropriate-for-gestational-age, Caucasian newborns together with their respective mothers participated in a cross-sectional study. The study aimed to assess the association between the FTO rs9939609 polymorphism in mother-neonate couples and neonatal anthropometrical measurements, insulin sensitivity and lipid and lipoprotein concentrations at birth was studied.

**Results.** Sixty-six-percent of mothers and neonates were A-carrier. TT-mothers gained less weight during pregnancy but non-significant maternal gene-influence was found for neonatal bodyweight, BMI or ponderal index. Neonates from A-carrier mothers showed lower glucose, insulin, and HOMA-IR but higher HOMA-IS and homocysteine than neonates whose mothers were TT. A-carrier neonates had higher insulin and HOMA-IR. Glucose, insulin, HOMA-IR, and arylesterase activity were higher in A-carrier neonates whose mothers were T-homozygous. A-carrier mothers had higher Mediterranean-diet-adherence (MDA) than TT ones. MDA was also higher in A-carrier mothers whose neonates were A-carrier.

**Conclusion.** A-carrier neonates presented increased insulin resistance markers at birth. This potential negative effect on glucose homeostasis was counterbalanced in neonates delivered by A-carrier mothers but not by TT ones, and seems related to MDA during pregnancy.

**Key words:** Appropriate for gestational age; FTO gene; Health eating index; Glucose; Insulin sensitivity; Lipids; Lipoproteins; Mediterranean diet adherence; Mothers; Term neonates.

## List of abbreviations:

AE, arylesterase; AGA, appropriate for gestational age; Apo, apolipoprotein; BMI, body mass index; CVD, cardiovascular disease; FTO, fat mass and obesity associated gene; GDM, gestational diabetes; HDL-c, cholesterol transported by high density lipoproteins; HEI, healthy eating index; HOMA-IR, homeostatic model assessment insulin resistance; HOMA-IS, homeostatic model assessment insulin sensitivity; LDL-c, cholesterol transported by low density lipoproteins; OxLDL, oxidized LDL; MDA, Mediterranean diet adherence; MS, metabolic syndrome; PI, ponderal index; QUICKI, quantitative insulin sensitivity check index; SNP, single nucleotide polymorphism; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TC, total cholesterol; tHcys, homocysteine; TG, triglycerides

## INTRODUCTION

Insulin sensitivity/resistance, as other metabolic syndrome (MS) components have been suggested to have a fetal programming [1]. The fat mass and obesity associated gene (FTO) is located on the long (q) arm of chromosome 16 at position 12.2. It consists of 9 exons. The rs9939609 FTO (T≥A) has been associated with body mass index (BMI) in several studies, altering the body weight of A-homozygous adults about 3 kg. FTO association with increased risk of childhood obesity was also demonstrated by Frayling et al. although the effects were observed at age seven [2]. The FTO expression is especially high in the hypothalamus, suggesting that this gene could be involved in the energetic balance [3]. The risk alleles have been associated with poorer eating behaviors [2,4,5], higher food, energy and fat intakes and specific preference for energy-dense foods with high fat content [6-12]. *In vitro* experiments suggest the possibility that FTO exert gene regulation at RNA levels in humans, catalyzing the demethylation of 3-methylthymine in single-strand DNA, 3-methyluracil in RNA [13-15] and N6-methyladenosine in nuclear RNA [16]. A possible role in energy homeostasis is supported by studies performed on humans, mice and rodents that have shown that *Fto* mRNA expression is regulated by food intake [3,13,17,18], circulating glucose levels [19], weight status [20,21] and energy expenditure [18,22].

Harbron et al. [23] investigated the association of FTO polymorphisms (rs1421085 and rs15817449) and food intake, eating behavior and changes in BMI in adults with BMI ≥27 kg/m<sup>2</sup>. The risk alleles were associated with higher hunger and emotional disinhibition scores, and with higher intakes of high fat foods and refined starch. Ortega-Azorín et al. [24] reported that the association of the FTO rs9939609 polymorphism with type 2 diabetes (T2DM) is highly modulated by diet in subjects presenting low adherence to the Mediterranean diet (MDA) pattern.

High quality diets during pregnancy have been recommended to assure a correct embryo and fetal growth and functionality [25]. In fact diets with high score for Health Eating Index (HEI) or MDA followed during pregnancy decrease the risk of both high insulin and HOMA-IR at birth [26]. In addition, neonates belonging to mothers that followed high score-MDA diets during pregnancy showed less cholesterol transported by LDL (LDL-c), apolipoprotein (Apo) B and homocysteine (tHcys) but higher Apo A1/Apo B ratio than neonates whose mothers followed low MDA-score diets [27].

Higher insulin resistance and preference for hypercaloric diets have been described in the A-carriers [12]. The information about the effects of FTO polymorphism on glucose and insulin levels in term neonate infants is scarce [28]. To the best of our knowledge, this is the first study associating neonatal and maternal FTO polymorphisms and lipid profile and tHcys at birth.

Moreover, the effect of this polymorphism on glucose and insulin levels at birth in appropriate-for-gestational-age (AGA) term neonates has never been tested.

Present paper hypothesizes that maternal and neonatal FTO polymorphisms affect neonatal parameters related to MS. The aims of this paper were a) to find out the effects of neonatal and maternal FTO rs9939609 polymorphism on different parameters related to insulin sensitivity/resistance, tHcys, lipid and lipoprotein levels at birth; b) the possible associations between the maternal and neonatal FTO polymorphism on those parameters; and c) the possible modulating effect of the maternal diet quality during pregnancy on these parameters.

## **METHODS AND MATERIALS**

### *Subjects*

It is a cross-sectional study performed in the Mérida Hospital (Badajoz, Spain), in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Management and Ethical Committee of the Mérida Hospital. Permission for DNA genotyping was obtained from 65 participating mothers. This sample belongs to the Mérida Cohort whose characteristics have been previously defined [29]. In order to avoid biases, some exclusions were performed: Two mothers were excluded because their data for the O'Sullivan test were not available; one mother-neonate couple, as the mother was diagnosed of gestational diabetes (GDM) and her child was delivered by cesarean section; two neonates that were not full-term and non-AGA; two being non-normoweight and non-AGA, and five were not full-term, non-normoweight and non-AGA. All selected neonates were Caucasian, singleton, full-term (between 37 and <42 weeks), normoweight (between 2.5 and <4.0 kg), AGA, born without fetal distress (Apgar 1 and Apgar 2 indices  $\geq 7$  and  $\geq 9$ , respectively), by eutocic delivery with cephalic presentation from non-GDM mothers. Thus, 53 mother-neonate couples were finally selected according to the inclusion criteria. The participation rate was about 24% of participating women in the Mérida Cohort Study.

Nutritional information during pregnancy together with FTO genotype were available in 30 mothers.

### *Protocol*

Clinical and anthropometrical data related to the delivery, mothers' age and neonatal characteristics (weight, length, sex, gestational age, Apgar 1 and Apgar 2 indices) were obtained from hospital records. Anthropometrical measurements were performed by trained personnel. After delivery, in order to avoid any contamination with maternal, blood, efflux, DNA or other

substances, blood cord was obtained by arterial puncture and collected in BD Vacutainer® SST II tubes containing separation gel (reference number 8019381) (Becton Dickinson, Plymouth, UK). Serum was obtained by blood centrifugation (3,500 rpm for 5 min) and aliquots were stored at -18 °C until processing.

#### Assays

Genomic DNA was isolated from whole blood. The rs9939609 FTO single nucleotide polymorphism (SNP) was determined using a 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems by Life Technologies) and a fluorescent allelic discrimination TaqMan™ assay by standard procedures. For quality control purposes, 10% of randomly selected samples were genotyped a second time, and there were no discrepancies. The calling rate was 95%. Genotype frequencies did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium expectations for either polymorphisms ( $P > 0.1$ ).

Serum glucose was measured by the glucose hexokinase method (Gluco-quant®, Roche Diagnostics) using the reagent kit reference number 11929534, total cholesterol (TC) concentrations were measured by the colorimetric enzymatic method (CHOD-PAP, Roche Diagnostics) using the reagent kit reference number 11875540. HDL-cholesterol (HDL-c) was measured by the homogeneous enzymatic method (HDL plus 2<sup>nd</sup> generation, Roche Diagnostics) using the reagent kits reference number 03038556 and 03038572, triglycerides (TG) were measured by the colorimetric enzymatic method (GPO-PAP, Roche Diagnostics) using the reagent kit reference number 11876023, LDL-c was calculated using the formula of Friedewald et al. as validated in neonates by Glueck et al. [30]. Apo A-I and Apo B were determined by the immunoturbidimetric method (Tina-quant®, Roche Diagnostics) using the reagent kits reference number 03032612 and 03032639, respectively. All of them were processed in a Roche/Hitachi Modular P (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) analyzer. Cortisol and insulin concentrations were determined by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA), using the reagent kit reference number 11875116 for cortisol and the reagent kit reference number 12017547 for insulin; both were supplied by Roche Diagnostics in a Roche/Hitachi Modular Analytics E 170 analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). tHcys was measured by fluorescence polarization immunoassay (FPIA) supplied by Abbott in an IMX® System analyser (Abbott Diagnostics, IL, USA). Arylesterase (AE) activity was measured according to Nus *et al.* method [31] at 37 °C. One unit of AE was defined as the mmol of phenol formed from phenyl acetate per minute monitored using a thermostated T80+ spectrophotometer (PG Instruments® Ltd. Wibtott, Leics, UK). Oxidized LDL (OxLDL) was determined using an ELISA test kit from Mercodia

Laboratories (Uppsala, Sweden). The colorimetric end point was measured at 450 nm using a model ELx808 BioTek® spectrophotometer (BioTek Instruments, Winoosky, VT, USA).

Our laboratory participates in the Spanish Clinical Chemistry Society (SEQC) External Quality Evaluation Program, which follows UNE-EN-ISO 9001:2000 standards and is certified by AENOR. All the assays were properly calibrated and performed under internal and external quality control provided by the manufacturers and SEQC, respectively. Intra-assay and inter-assay variation coefficients were 1% and 1.7% for glucose; 1.5% and 4.9% for insulin; 0.8% and 1.7% for TC; 1.5% and 1.8% for TG; 0.9% and 1.85% for HDL-c; 1% and 2.4% for Apo A-I; 1.5% and 2.5% for Apo B; 2.3% and 2.8% for tHcys; 8% and 8.9% for AE; and 4.5% and 5.0% for OxLDL, respectively.

The indices used to test insulin resistance or sensitivity were the Quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI), calculated as  $1/[\log \text{Insulin (mUI/L)} + \log \text{Glucose (mg/dL)}]$ . Homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR), as:  $\text{Glucose (mmol/L)} \times \text{Insulin (}\mu\text{IU/mL)} / 22.5$ ; and Homeostatic model assessment-insulin sensitivity (HOMA-IS), as  $1/\text{HOMA-IR}$ . In addition, the glucose/insulin and insulin/cortisol ratios were calculated.

#### *Dietary data collection.*

Details of dietary collection and managements have been already published [26]. Briefly, participants, guided by a trained dietician, completed a FFQ that included 169 items classified according to food groups and based on FFQs used and validated previously. Photographs of sample portions were used to estimate the serving size and volumes consumed. The dietician reviewed, together with the volunteer, the usual consumption frequency of each food (per day/week/month), together with the normal food helping size. Information about different group consumption and dietary habits was also obtained during pregnancy.

HEI and MDA, used as global dietary quality indices, were evaluated in 30 mothers following criteria stated in a previous paper [26]. The test for evaluating MDA was an adaptation to 13-point scale after considering alcohol should not be consumed during pregnancy. Cut-off points for HEI and MDA were 70 and 7, respectively as previously indicated [26]. From the 30 mothers evaluated, 10 were TT while 20 were A-carrier. Nine of their neonates were TT while 21 were A-carrier. With respect the maternal\*neonatal FTO association, 16 were A-carrier neonate\*A-carrier mother; 5, A-carrier neonate\*TT mother; and 9, TT neonate\*all mothers.

#### *Statistics*

The Z Kolmogorov-Smirnov test was used for testing the normal data distribution. Insulin sensitivity/resistance markers and TG were normalized by natural log transformation. Data were adjusted for maternal glycaemia after the O'Sullivan test. Neonatal glucose, insulin and TC were considered major outcomes. Taken into account allele prevalence of rs9939609 FTO in Mediterranean populations [32] this study showed a power at least of 85% (nominal  $\alpha=0.05$ ) to detect mean differences between A-allele-carrier and TT neonate groups of 12 mg/dL for TC, 3 mIU/L for insulin and 20 mg/dL for glucose. The power for comparisons between neonate\*mother association groups was higher than 70%. The interaction between maternal and neonatal FTO polymorphisms was tested in three groups (A-carrier neonate\*A-carrier mother, A-carrier neonate\*TT mother, and TT neonate\*any mother genotype) by univariate ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. Statistical significance was set at  $P<0.05$ . Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package (versions 15.0), and SAS Power and Sample size version 12.3 Copyright © 2013 by SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

## RESULTS

Anthropometrical and biochemical data of selected neonates and their respective mothers did not significantly differ from AGA-neonate sample of the Mérida study (data not shown) [29]. FTO rs9939609 genotypes for neonates and mothers were in Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.05$ ). Eighteen mothers were T homozygous and 35 were A-carrier while 17 neonates were T homozygous and 36 were A-carrier. **Table 1** shows some anthropometrical, analytical and dietary characteristics of the studied mothers. Weight gain during pregnancy was significantly higher in A-carrier mothers ( $P=0.038$ ). TT mothers showed significantly lower MDA-score diet ( $P=0.006$ ), but non-significantly higher HEI-scores. Mothers of A-carrier and T homozygous neonates show equivalent age, pre-pregnancy weights, pregnancy weight gain, and diet quality scores.

The anthropometrical and clinical characteristics of the group of 30 TT and A-carrier mothers (and their respective children) whose nutrition data were available did not significantly differ from those of the whole group of 53 mother-neonate couples studied in the present paper.

**Table 2** shows the effects of maternal and neonatal FTO polymorphisms on the neonatal anthropometry and insulin sensitivity/resistance markers. Offspring of A-carrier mothers presented lower glucose ( $P=0.015$ ), insulin ( $P=0.049$ ) and HOMA-IR ( $P=0.015$ ), but higher HOMA-IS ( $P=0.015$ ) at birth than that of TT mothers. However, A-carrier neonates had higher insulin ( $P=0.048$ ) and HOMA-IR ( $P=0.035$ ) than their T homozygous counterparts.

**Table 3** shows the effect of maternal and neonatal FTO polymorphisms on neonatal tHcys, lipids and lipoproteins. Only tHcys ( $P=0.029$ ) was affected by the maternal FTO polymorphism. Neonates born from A-carrier mothers showed higher tHcys levels than those from T homozygous mothers. Taking into account the neonatal FTO polymorphism, A-carrier neonates showed marginally significant lower ( $P=0.058$ ) TG levels than their TT counterparts.

**Figure 1** shows the percentage of neonates from A-carrier and TT mothers that presented values that lay below P25 or above P75 described in the Mérida study reference population for some components of the MS (glucose, TG, insulin, TC, HOMA-IR) [29,33]. Lower levels of MS markers were more prevalent in neonates whose mothers were A-carrier.

**Figure 2** shows the FTO neonate\*mother interactions. No significant differences were noted between groups for pregnancy weight gain, although pre-pregnancy weight tended to be ( $P=0.099$ ) associated. A-carrier neonates from TT mothers displayed higher levels of glucose, insulin, AE, and HOMA-IR (all  $P<0.05$ ). No significant differences in birthweight were found between group neonates.

Mothers' diet in the A-carrier neonate\*TT-mother association group showed MDA-scores significantly lower ( $P=0.05$ ) than those in the A-carrier neonate\*A-carrier mother group. The anthropometrical and clinical characteristics of the 30 mothers (and that of their respective children) distributed in the three association groups where nutrition data were available did not significant differ from those of the total three groups whole mother-neonate couples studied.

## DISCUSSION

The information about the relationship between obesogenic genes and metabolic parameters in mothers and children at birth is scarce. This paper shows the results of the influence of rs9939609 FTO (T $\geq$ A) on insulin sensitivity/resistance and lipoprotein markers in 53 strictly selected mother-neonate couples. Similarly to other Mediterranean populations, about two third of participating mothers and neonates were A-carrier [32].

Most relevant results show that newborns from A-carrier mothers have lower insulin and HOMA-IR than their TT counterparts while opposite results were found in A-carrier neonates. A higher percentage of neonates under the P25 level assessed by Gesteiro et al. [33] for some MS components (Glucose TG, HOMA-IR, insulin and TC) were delivered by A-carrier mothers. Adjusting data for maternal glycaemia after the O'Sullivan test gives strength to our study.

In agreement with previous studies [2,24,34,35] no significant associations between the maternal or neonatal FTO rs9939609 polymorphism and birthweight, height, BMI or ponderal index (PI) at birth were found. Several research groups tried to find when the FTO effect on BMI

begins. Frayling *et al.* [2] reported that rs9939609 polymorphism was associated with changes in BMI and obesity in children at age 7. Da Silva *et al.* [36] observed significant differences in BMI and energy intake from lipids at 4 years old. Rzehak *et al.* [37] found no association of FTO-variants with birthweight in the GINI and LISA birth cohorts but could show that significant association developed over time in their population at age 4. López Bermejo *et al.* [28] assessed that at age 2 weeks some differences in PI, weight and body fat composition associated to the FTO polymorphism were observed.

A-carrier mothers had 6.9% higher pre-pregnancy weight and gained 18.8% more weight during pregnancy than their T homozygous counterparts. Similar results on pregnant A-carriers have been observed by Lawlor *et al.* [34]. FTO polymorphisms have been associated with eating behaviour and type of food consumed [2-4,23]. MDA and HEI scores tended to be lower and higher, respectively, in TT than in A-carrier mothers. The former display a tendency for a higher consumption of animal foods and lower for some vegetables (data not shown), explaining the differences in the quality of diets found. Unfortunately dietary information was not available in all the genotyped mothers; thus, values have to be taken just as an approach. Nonetheless, according to a previous study [26], despite differences in mothers' MDA or HEI scores, neonates display similar bodyweight but their insulin sensitivity/resistance markers were highly affected by their mother's diet quality during pregnancy.

In adults, several studies have reported significant higher risk of T2DM in FTO A-carriers [38-40]. However, this association was attenuated after adjustment for BMI. Others have defined the association of FTO and MS in different populations [10,41-43]. Interestingly, it has been reported that the association between the FTO-rs9939609 polymorphism and T2DM in adults was modulated by diet [24]. Thus, in A-carriers, there was a high risk of T2DM when MDA was low even after adjustment for BMI, which did not appear when MDA was high [24].

In our study all mothers had equivalent fasting glycaemia in pregnancy. The distribution of mothers being positive for the O'Sullivan test [44] was not significantly different between the three mother FTO rs9939609 groups. In addition, in order to increase the strength of this research, data were adjusted for maternal glycaemia after the O'Sullivan test.

As commented before, newborns from A-carrier mothers had lower MS level components than their TT counterparts. These results could appear as controversial because it has been reported that A-carriers are more prone to develop obesity and T2DM in adulthood; thus, to a higher glucose homeostasis and lipid markers modification [39,40]. Moreover, in 30-40% of the neonates from T homozygous mothers mean glucose, insulin and HOMA-IR were higher than the P75 reference value, while a very low percentage of cases (<10%) were lower than the P25



described by Gesteiro et al. [33]. In the case of A-carriers' offspring, between 20 and 40% neonates had values of these glucose homeostasis markers under the P25 of Gesteiro et al. [33] (Figure 1). In addition, T homozygous mothers delivered more frequently neonates with high (>P75) and less frequently neonates with low (<P25) levels of MS markers than their A-carrier counterparts (Figure 1).

Neonates from A-carrier mothers had higher tHcys levels than their TT counterparts, potentially related with the dysfunctional methylation suggested by Selhub [45]. Although most of the biological functions of FTO have not been fully elucidated, it is known that it works as part of a complex process involving methylation and demethylation of nucleic acids [15,16,46].

MS is a multifactorial pathology where the main components are insulin resistance, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, obesity and hypertension [47]. MS cut-off points are well defined for adults while for children and adolescents the criteria are based on percentile values [28,29]. When analyzing our results and relating them to the MS components, we find that the neonates from A-carrier mothers have significantly lower glucose, insulin and HOMA-IR and higher HOMA-IS than their T homozygous counterparts. This seems unexpected taking into account previous results in adults showing that T homozygous are less affected by BMI changes, obesity [2], T2DM [48], and are less prone to develop cardiovascular disease (CVD) [49].

In contrast to the influence of maternal FTO on neonatal insulin resistance profile already discussed, A-carrier neonates showed increased insulin and HOMA-IR suggesting that insulin resistance is already present in normoweights at birth. These findings concur with reference data for adults where A-allele was associated to higher MS risk [39,41,50]. However, López Bermejo et al. [28] did not find any significant difference in glucose or insulin levels between the different FTO genotypes at birth. Although our study presents limitations due to the small sample size, it seems relevant the fact that belonging to A-carrier mother offspring does not necessary imply suffering the negative effects attributed to the A-allele. In fact, lower neonatal levels of glucose, insulin, AE, and HOMA-IR were found in neonates when the neonatal\*maternal A-carrier association was present with respect to the A-carrier neonate\*TT mother counterpart (Figure 2). These results, could be related to the higher MDA-score and similar HEI-score of maternal diet found in the A-carrier neonate\*A-carrier mother group, suggesting the benefits of the high MDA already indicated [26]. Western diets are rich in saturated fatty acids and poor in carbohydrates, dietary factors related with the insulin-resistance development [26,51,52]. Drake and Liu [53] have reported some hypothesis on the intergenerational transmission of the programmed phenotype, including maternal effects and the transmission of epigenetic information through the germline. However, we are far from knowing major mechanisms involved in this maternal-

neonatal genotype association. Moreover, we also do not know whether the association effects found at birth would be also present later in life in case of consuming diets similar to those followed during gestation by their respective mothers, and should be checked future follow up study.

Although this study shows some limitations as a) the relatively low number of mother-neonate couples tested, b) only SNP rs9939609 was studied, c) some environmental factors (e.g. diet pattern) were considered in 57% of mothers; it has several strengths a) all studied neonates were Caucasian, full term, normoweight, AGA, born without fetal distress in eutocic delivery, their mothers did not suffer from GDM and had an adequate weight gain during pregnancy, b) all the results were adjusted for maternal glycaemia after the O'Sullivan test as confounder factor, c) it is the first study associating neonatal and maternal FTO polymorphisms with glucose homeostasis, lipid profile and tHcys at birth counterbalancing the already mentioned limitations.

## CONCLUSION

Maternal FTO rs9939609 polymorphism affects in an opposite manner than neonatal FTO the insulin sensitivity and CVD makers in term, normoweight, AGA neonates at birth. The potential negative effects on glucose homeostasis observed in A-carrier neonates were counterbalanced in neonates delivered by A-carrier but not by T homozygous mothers, probably due to differences in the quality of their diets during pregnancy. Further investigations, replicating the present associations in a larger population, are desirable to understand this interesting maternal-neonatal interaction.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by the Spanish AGL-2011 29644-C02-02 and CIBER 06/03/035 projects and the Nutrición y Salud Cardiovascular Research group of the UCM #920536. Thanks are due to the Gynecology and Obstetrics Department and Laboratory Services of Mérida Hospital (Badajoz, Spain), participant mothers and neonates, and Carmen Bravo from Departamento de Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense of Madrid. All authors have significantly contributed to the paper and agree with the present version of the manuscript. FJSM is the corresponding author and Guarantor of the paper and has contributed to the study design, data discussion and writing of the paper. EG has contributed to the data acquisition, analysis and discussion and writing of the paper. CO-A and MG has contributed to the data acquisition and analysis. SB has contributed to the study design and data discussion while DC to the data discussion and writing of the paper.

## REFERENCES:

1. Barker DJP (1998) *In utero* programming of chronic disease. Clin Sci 95:115-128.
2. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with the body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. Science 316:889-894.
3. Tung YC, Ayuso E, Shan X, Bosch F, O'Rahilli S, Coll AP, Yeo GS (2010) Hypothalamic specific manipulation of *Fto*, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. PLoS One 5 e8771.
4. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoecur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. Nat Genet 39:724-726.
5. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR (2007) Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. PLoS Genet 3:e115.
6. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CN (2008) An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. N Engl J Med 359:2558-2566.
7. Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM (2008) Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. Obesity 16:1961-1965.
8. Haupt A, Thamer C, Staiger H, Tschrirter O, Kirchhoff K, Machicao F, Häring HU, Stefan N, Fritsche A (2009) Variation in the FTO gene influences food intake but not energy expenditure. Exp Clin Endocrinol Diabetes 117:194-197.
9. Tanofsky-Kraff M1, Han JC, Anandalingam K, Shomaker LB, Columbo KM, Wolkoff LE, Kozlosky M, Elliott C, Ranzenhofer LM, Roza CA, Yanovski SZ, Yanovski JA. (2009) The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. Am J Clin Nutr 90: 1483-1488.

10. Wardle J, Llewellyn C, Sanderson S, Plomin R (2009) The *FTO* gene and measured food intake in children. *Int J Obes (Lond)* 33:42-45.
11. McCaffery JM, Papandonatos GD, Peter I, Huggins GS, Raynor HA, Delahanty LM, Cheskin LJ, Balasubramanyam A, Wagenknecht LE, Wing RR et al. (2012) Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *Am J Clin Nutr* 95:1477-1486.
12. Rodríguez-López R, González-Carpio M, Serrano MV, Torres G, García de Cáceres MT, Herrera T, Román, A, Rubio M, Méndez P, Hernández-Sáez R, et al. (2010) Association of *FTO* gene polymorphisms and morbid obesity in the population of Extremadura (Spain). *Endocrinol Nutr* 57:203-209.
13. Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, et al. (2007) The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318:1469-1472.
14. Han Z, Niu T, Chang J, Lei X, Zhao M, Wang Q, Cheng W, Wang J, Feng Y, Chai J (2010) Crystal structure of the *FTO* protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* 464:205-209.
15. Jia G, Yang C, Yang S, Jian X, Yi C, Zhou Z, He C (2008) Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human *FTO*. *FEBS Lett* 582:3313-3319.
16. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated *FTO*. *Chem Biol* 7:885-887.
17. Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM, Levine AS, Lindblom J, Schiöth HB (2008) The obesity gene, *FTO*, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149:2062-2071.
18. Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, Zeltser LM, Chung WK, Leibel RL (2008) Regulation of *Fto/Ftm* gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1185-R1196.
19. Poritsanos NJ, Lew PS, Fischer J, Mobbs CV, Nagy JI, Wong D, Rüther U, Mizuno TM (2011) Impaired hypothalamic *Fto* expression in response to fasting and glucose in obese mice. *Nutr Diabetes* 1:e19.
20. Wåhlén K, Sjölin E, Hoffstedt J (2008) The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene *FTO* is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* 49:607-611.

21. Zabena C, González-Sánchez JL, Martínez-Larrad MT, Torres-García A, Alvarez-Fernández-Represa J, Corbatón-Anchuelo A, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M (2009) The *FTO* obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 19:87-95.
22. Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, Rütger U (2009) Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity. *Nature* 458:894-988.
23. Harbron J, van der Merwe L, Zaahl MG, Kotze MJ, Senekal M (2014) Fat Mass and Obesity-associated (*FTO*) gene polymorphisms are associated with physical activity, food intake, eating behaviors, psychological health, and modeled change in Body Mass Index in overweight/obese Caucasian adults. *Nutrients* 6:3130-3152.
24. Ortega-Azorín C1, Sorlí JV, Asensio EM, Coltell O, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Covas MI, Arós F, Lapetra J, Serra-Majem L, Gómez-Gracia E, Fiol M, Sáez-Tormo G, Pintó X, Muñoz MA, Ros E, Ordovás JM, Estruch R, Corella D (2012) Associations of the *FTO* rs9939609 and the *MC4R* rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. *Cardiovasc Diabetol* 11:137.
25. Sánchez-Muniz FJ, Gesteiro E, Espárrago Rodilla M, Rodríguez Bernal B, Bastida S (2013) Maternal nutrition during pregnancy conditions the fetal pancreas development, hormonal status and Diabetes mellitus and metabolic syndrome biomarkers at birth. *Nutr Hosp* 28:250-274.
26. Gesteiro E, Rodríguez-Bernal B, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ (2012) Maternal diets with low healthy eating index or Mediterranean diet adherence scores are associated with high cord-blood insulin levels and insulin resistance markers at birth. *Eur J Clin Nutr* 66:1008-1015.
27. Gesteiro E, Bastida S, Rodríguez Bernal B, Sánchez-Muniz FJ (2014) Adherence to Mediterranean diet during pregnancy and serum lipid, lipoprotein and homocysteine concentrations at birth. *Eur J Nutr* Nov 20. [Epub ahead of print]. DOI
28. López Bermejo A, Petry CJ, Díaz M, Sebastiani G, de Zegher F, Dunger DB, Ibáñez L, (2008) The association between the *FTO* gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1501-1505.
29. Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ (2013) Cord-blood lipoproteins, homocysteine, insulin sensitivity/resistance marker profile, and concurrence of dysglycaemia and dyslipaemia in full-term neonates of the Mérida Study. *Eur J Pediatr* 172: 883-894.
30. Glueck CJ, Steiner P, Leuba U (1973) Cord blood low-density lipoprotein-cholesterol estimation versus measurement with the preparative ultracentrifuge. *J Lab Clin Med* 82:467-472.

31. Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM (2006) A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using simulated body fluid. *Atherosclerosis* 188:155-159.
32. Corella D, Carrasco P, Sorlí JV, Coltell O, Ortega-Azorín C, Guillén M, González JI, Sáiz C, Estruch R, Ordovas JM (2012) Education modulates the association of the FTO rs9939609 polymorphism with body mass index and obesity risk in the Mediterranean population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22:651-658.
33. Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ (2009) Insulin resistance markers in term, normoweight neonates. The Merida cohort. *Eur J Pediatr* 168:281-288.
34. Lawlor DA, Fraser A, Macdonald-Wallis C, Nelson SN, Palmer TM, Smith GD, Tilling K (2011) Maternal and offspring adiposity-related genetic variants and gestational weight gain. *Am J Clin Nutr* 94:149-155.
35. Labayen I, Ruiz JR, Ortega FB, Gottrand F, Huybrechts I, Dallongeville J, Widhalm K, Ferrari M, Buyken A, Kersting M, Moschonis G, Turck D, Gómez S, Sjostrom M, Meirhaeghe A, Moreno LA (2012) Body size at birth modifies the effect of fat mass and obesity associated (FTO) rs9939609 polymorphism on adiposity in adolescents: the Healthy Lifestyle in Europe by nutrition in Adolescence (HELENA) study. *Br J Nutr* 107:1498-1504.
36. da Silva FC, Zandoná MR, Vitolo MR, Campagnolo PD, Rotta LN, Almeida S, Mattevi VS (2013) Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC Medical Genetics* 14:34.
37. Rzehak P, Scherag A, Grallert H, Sausenthaler S, Koletzko S, Bauer CP, Schaaf B, von Berg A, Berdel D, Borte M, Herbarth O, Krämer U, Illig T, Wichmann HE, Hebebrand J, Heinrich J; GINI and LISA Study Group (2010) Associations between BMI and the FTO gene are age dependent: results from the GINI and LISA birth cohort studies up to age 6 years. *Obes Facts* 3:173-180.
38. Abbas S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Rizvi S, Mahdi F (2013) Association of genetic polymorphism of PPAR $\gamma$ -2, ACE, MTHFR, FABP-2 and FTO genes in risk prediction of T2DM. *J Biomed Sci* 20:80.
39. Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, Ross K, Edwards M, Angeles-Martinez J, Ortega-Camarillo C, de la Peña JE, Burguete-Garcia AI, Wachter-Rodarte N, Ambriz R, Rivera R, D'artote AL, Peralta J, Parra EJ, Kumate J (2010) Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev* 26:261-270.

40. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T (2007) Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50:2461-2466.
41. Al-Attar SA, Pollex RL, Ban MR, Young TK, Bjerregaard P, Anand SS, Yusuf S, Zinman B, Harris SB, Hanley AJ, Connelly PW, Huff MW, Hegele RA. (2008) Association between the FTO rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-Caucasian multi-ethnic sample. *Cardiovasc Diabetol* 7:5.
42. Attaoua R, Ait El Mkadem S, Radian S, Fica S, Hanzu F, Albu A, Gheorghiu M, Coculescu M, Grigorescu F (2008) FTO gene associates to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 373:230-234.
43. Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Mizusawa S, Matsuo T, Nakata Y, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Hamaguchi K, Tanaka K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Sakata T, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A (2011) Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. *J Hum Genet* 59:647-651.
44. O'Sullivan BA, Henderson ST, Davis JM (1998) Gestational diabetes. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 38:364-371; quiz 372-373.
45. Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 19:217-246.
46. Davis W, van Rensburg SJ, Cronje FJ, Whati L, Fisher LR, van der Merwe L, Geiger D, Hassan MS, Matsha T, Erasmus RT, Kotze MJ. (2014) The fat and obesity associated FTO rs9939609 polymorphism is associated with elevated homocysteine levels in patients with multiple sclerosis screened for vascular risk factors. *Metab Brain Dis* 29:409-419.
47. Alberti K, Zimmet PZ, Shaw JE (2005) The metabolic syndrome – a new world wide definition from the International Diabetes Federation Consensus. *Lancet* 366:1059-1062.
48. Hertel JK, Johansson S, Sonestedt E, Jonsson A, Lie RT, Platou CG, Nilsson PM, Rukh G, Midthjell K, Hveem K, Melander O, Groop L, Lyssenko V, Molven A, Orho-Melander M, Njølstad PR. (2011) FTO, type 2 diabetes, and weight gain throughout adult life: a meta analysis of 41,504 subjects from the Scandinavian HUNT, MDC and MPP studies. *Diabetes* 60:1637-1644.
49. Liu C, Mou S, Pan C (2013) The FTO gene rs9939609 polymorphism predicts risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8:e71901.
50. Zhou D, Liu H, Zhou M, Wang S, Zhang J, Liao L, He F (2012) Common variant (rs9939609) in the FTO gene is associated with metabolic syndrome. *Mol Biol Rep* 39:6555-6561.

51. Sánchez-Muniz FJ, Gesteiro E, Espárrago-Rodilla M, Rodríguez Bernal B, Bastida S (2013) Maternal nutrition during pregnancy conditions the fetal pancreas development, hormonal status and diabetes mellitus and metabolic syndrome biomarkers at birth. *Nutr Hosp* 28:250-274.
52. Nettleton JA, Jebb S, Risérus U, Koletzko B, Fleming J (2014) Role of dietary fats in the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab* 64:167-178.
53. Drake AJ, Liu L (2010) Intergenerational transmission of programmed effects: public health consequences. *Trends Endocrinol Metab* 21:206-213.



**Table 1.** Maternal age, weight, serum glucose and cholesterol, Health Eating Index (HEI) and Mediterranean Diet Adherence (MDA) of the studied population depending on the maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism.

Parameters	Maternal FTO	N	Values	ANOVA (P)	Neonatal FTO	N	Values	ANOVA (P)
<b>Mother age</b> (yrs)	TT	18	30.25±7.51 (26.68-33.88)	0.421	TT	17	32.08±4.60 (29.83-34.33)	0.085
	A carriers	35	29.06±4.43 (27.55-30.57)		A carriers	36	28.38±5.35 (26.58-30.18)	
<b>Pre-pregnancy weight</b> (kg)	TT	18	60.5 ±9.4 (55.2-64.8)	0.110	TT	17	61.4 ±8.3 (50-72)	0.197
	A carriers	35	64.7±8.3 (61-67.4)		A carriers	36	64.8 ± 8.4 (61.9-67.6)	
<b>Pregnancy weight gain</b> (kg)	TT	18	10.1 ±2.3 (8.9-11.3)	0.038	TT	17	10.4 ±2.1 (9.2-11.6)	0.094
	A carriers	35	12.0 ±3.2 (10.8-13.1)		A carriers	36	11.9±0.7 (10.6-13.3)	
<b>Mother glucose</b> (mg/dL)	TT	18	84.17±7.07 (80.80-87.54)	0.440	TT	17	82.58±4.12 (80.56-84.60)	0.339
	A carriers	35	82.88±5.49 (81.00-84.76)		A carriers	36	83.47±6.48 (81.29-85.65)	
<b>Negative/Positive</b>	TT	12/6		0.230	TT	10/7		0.530
<b>O'Sullivan test</b>	A carriers	28/7			A carriers	26/10		
<b>Mother cholesterol</b> (mg/dL)	TT	18	222.6±32.6 (207.0-238.1)	0.129	TT	17	235.6±37.5 (217.2-253.9)	0.598
	A carriers	35	249.2±50.9 (231.9-266.6)		A carriers	36	242.9±50.6 (225.9-260.0)	
<b>HEI</b>	TT	10	72.8±9.8 (65.7-79.8)	0.206	TT	9	74.3±10.0 (66.6-82.0)	0.286
	A carriers	20	67.8±10.2 (63.0-72.5)		A carriers	21	69.9±10.4 (65.1-74.6)	
<b>MDA</b>	TT	10	5.91±0.76 (5.36-6.46)	0.006	TT	9	7.04±1.21 (6.11-7.97)	0.287
	A carriers	20	7.04±1.08 (6.54-7.55)		A carriers	21	6.57±1.04 (6.10-7.04)	

Values are mean ± SD (95% CI) once adjusted for maternal glycaemia after O'Sullivan test.\*Chi square test

**Table 2.** Neonatal anthropometrical parameters, glucose and insulin resistance/sensitivity markers of the studied population at birth depending on the maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism.

Neonatal Parameters	Maternal FTO	N	Values	ANOVA (P)	Neonatal FTO	N	Values	ANOVA (P)
<b>Gestational age</b> (wks)	TT	18	39.75±1.29 (39.14-40.36)	0.437	TT	17	39.17±1.27 (38.55-39.79)	0.138
	A carriers	35	39.47±0.95 (39.15-39.79)		A carriers	36	39.69±0.93 (39.38-40.00)	
<b>Neonatal weight</b> (kg)	TT	18	3.41±0.28 (3.27-3.54)	0.949	TT	17	3.33±0.32 (3.18-3.49)	0.298
	A carriers	35	3.41±0.30 (3.31-3.52)		A carriers	36	3.44±0.28 (3.34-3.53)	
<b>Neonatal BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	TT	18	13.93±0.98 (13.47-14.39)	0.376	TT	17	13.56±1.03 (13.06-14.06)	0.568
	A carriers	35	13.61±1.09 (13.25-13.97)		A carriers	36	13.75±1.08 (13.39-14.11)	
<b>Neonatal PI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	TT	18	28.24±2.70 (26.95-29.53)	0.206	TT	17	27.43±2.76 (26.08-28.78)	0.856
	A carriers	35	27.20±2.29 (26.42-27.98)		A carriers	36	27.50±2.33 (26.72-28.28)	
<b>Glucose</b> (mg/dL)	TT	18	84.33±31.77 (69.20-99.46)	0.015	TT	17	73.25±11.43 (67.66-78.84)	0.700
	A carriers	35	65.41±17.03 (57.57-71.25)		A carriers	36	69.56±26.43 (60.66-78.46)	
<b>Insulin</b> (mIU/L)	TT	18	7.09±5.39 (4.52-9.66)	0.049	TT	17	3.46±1.82 (2.58-4.33)	0.048
	A carriers	35	4.25± 3.05 (3.70-4.80)		A carriers	36	5.62±4.36 (4.15-7.19)	
<b>Glucose/Insulin</b>	TT	18	19.09±10.39 (14.14-24.04)	0.235	TT	17	31.41±20.27 (21.48-41.34)	0.108
	A carriers	35	26.51±20.22 (19.60-33.42)		A carriers	36	21.89±17.07 (16.14-27.64)	
<b>HOMA-IR</b>	TT	18	1.65±2.01 (0.70-2.62)	0.015	TT	17	0.62±0.30 (0.47-0.77)	0.035
	A carriers	35	0.68±0.54 (0.50-0.86)		A carriers	36	1.07±1.02 (0.73-1.41)	
<b>HOMA-IS</b>	TT	18	1.44±1.06 (0.93-1.95)	0.015	TT	17	2.56± 1.94 (1.61-3.51)	0.682
	A carriers	35	2.87±2.45 (2.04-3.70)		A carriers	36	2.45± 2.38 (1.65-3.25)	
<b>QUICKI</b>	TT	18	0.43± 0.07 (0.390-0.47)	0.737	TT	17	0.42±0.08 (0.38-0.46)	0.934
	A carriers	35	0.42± 0.09 (0.38-0.46)		A carriers	36	0.43±0.08 (0.41-0.45)	

Values are mean ± SD (95% CI) once adjusted for maternal glycaemia after the O'Sullivan test. HOMA-IR and HOMA-IS, homeostasis model assessment insulin resistance and sensitivity, respectively. QUICKI, quantitative insulin check index.




**Table 3.** Lipids, lipoproteins, apolipoproteins, homocysteine and arylesterase at birth depending on the maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism.

Neonatal Parameters	Maternal FTO	N	Values	ANOVA (P)	Neonatal FTO	N	Values	ANOVA (P)
<b>Triglycerides</b> (mg/dL)	TT	18	36.33±12.12 (30.55-42.11)	0.735	TT	17	43.75±16.58 (35.63-51.87)	0.058
	A carriers	35	34.78±17.90 (28.66-40.90)		A carriers	36	32.00±15.38(26.82-37.18)	
<b>Total cholesterol</b> (mg/dL)	TT	18	64.00±14.95 (56.89-71.11)	0.462	TT	17	65.58±10.99 (60.20-70.96)	0.230
	A carriers	35	60.34±14.16 (55.51-55.17)		A carriers	36	59.75±15.20 (54.63-64.87)	
<b>HDLc</b> (mg/dL)	TT	18	28.83±9.18 (24.47-33.19)	0.313	TT	17	26.92±5.60 (24.18-29.66)	0.817
	A carriers	35	25.97±7.61 (23.36-28.58)		A carriers	36	26.71±8.93 (23.70-29.72)	
<b>LDLc</b> (mg/dL)	TT	18	27.90±8.28 (23.96-31.84)	0.748	TT	17	29.92±6.44 (26.77-33.07)	0.216
	A carriers	35	26.87±9.60 (23.60-30.14)		A carriers	36	26.08±9.91 (22.74-29.42)	
<b>OxLDL</b> (mg/dL)	TT	18	45.58±58.26 (17.85-73.31)	0.685	TT	17	29.37±23.84 (17.69-41.05)	0.162
	A carriers	35	48.90±33.60 (37.43-60.33)		A carriers	36	54.91±43.90 (40.13-69.69)	
<b>ApoA1</b> (mg/dL)	TT	18	76.47±12.92 (70.31-82.63)	0.320	TT	17	77.87±9.08 (73.43-82.31)	0.118
	A carriers	35	72.09±12.41 (67.85-76.33)		A carriers	36	71.56±13.35 (67.07-76.05)	
<b>ApoB</b> (mg/dL)	TT	18	29.96±30.55 (15.42-44.50)	0.933	TT	17	36.87±29.26 (22.54-51.20)	0.174
	A carriers	35	29.47±15.74 (23.41-35.53)		A carriers	36	26.88±15.72 (21.59-32.17)	
<b>Homocysteine</b> (µmol/L)	TT	18	4.83± 1.80 (3.98-5.68)	0.029	TT	17	5.53±0.95 (5.07-5.99)	0.877
	A carriers	35	5.92± 1.28 (5.48-6.36)		A carriers	36	5.66±1.67 (5.10-6.22)	
<b>Arylesterase (U/L)</b>	TT	18	34.40±30.22 (20.02-48.78)	0.410	TT	17	17.29±17.33 (8.80-25.78)	0.167
	A carriers	35	25.76±26.70 (16.65-34.87)		A carriers	36	31.64±29.60 (21.68-41.60)	

Values are mean ± SD (95% CI) once adjusted for maternal glycaemia after the O'Sullivan test. LDLc and HDLc, cholesterol transported by LDL and HDL, respectively; Apo, apolipoprotein; oxLDL, oxidized LDL

### Figure captions

**Figure 1.** Percentage of whose mothers were genotyped for FTO rs9939609 neonates presenting high or low metabolic syndrome (MS) risk compounds. The percentile 25 for low levels and the percentile 75 for high levels stated by Gesteiro et al. [29,33] were considered.

**Figure 2.** Influence of maternal and neonatal FTO rs9939609 polymorphism association on pregestational weight ( $P=0.099$ ), weight gain ( $P>0.1$ ) and birth weight ( $P>0.1$ ), glucose ( $P=0.020$ ), insulin ( $P=0.042$ ), HOMA-IR ( $P=0.028$ ), and arylesterase ( $P<0.001$ ), values at birth. HOMA-IR and HOMA-IS, homeostasis model assessment insulin resistance and sensitivity, respectively.  A-carrier neonates\*A-carrier mothers (N=27),  A-carrier neonates\*TT mothers (N=9), and  TT neonates\*all their mothers (N=16). Maternal Health Eating Index (HEI) ( $P>0.1$ ) and maternal Mediterranean Diet Adherence (MDA) ( $P<0.001$ ) were determined in 16, 5, and 9 mothers from the already cited groups, respectively. Bars bearing different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

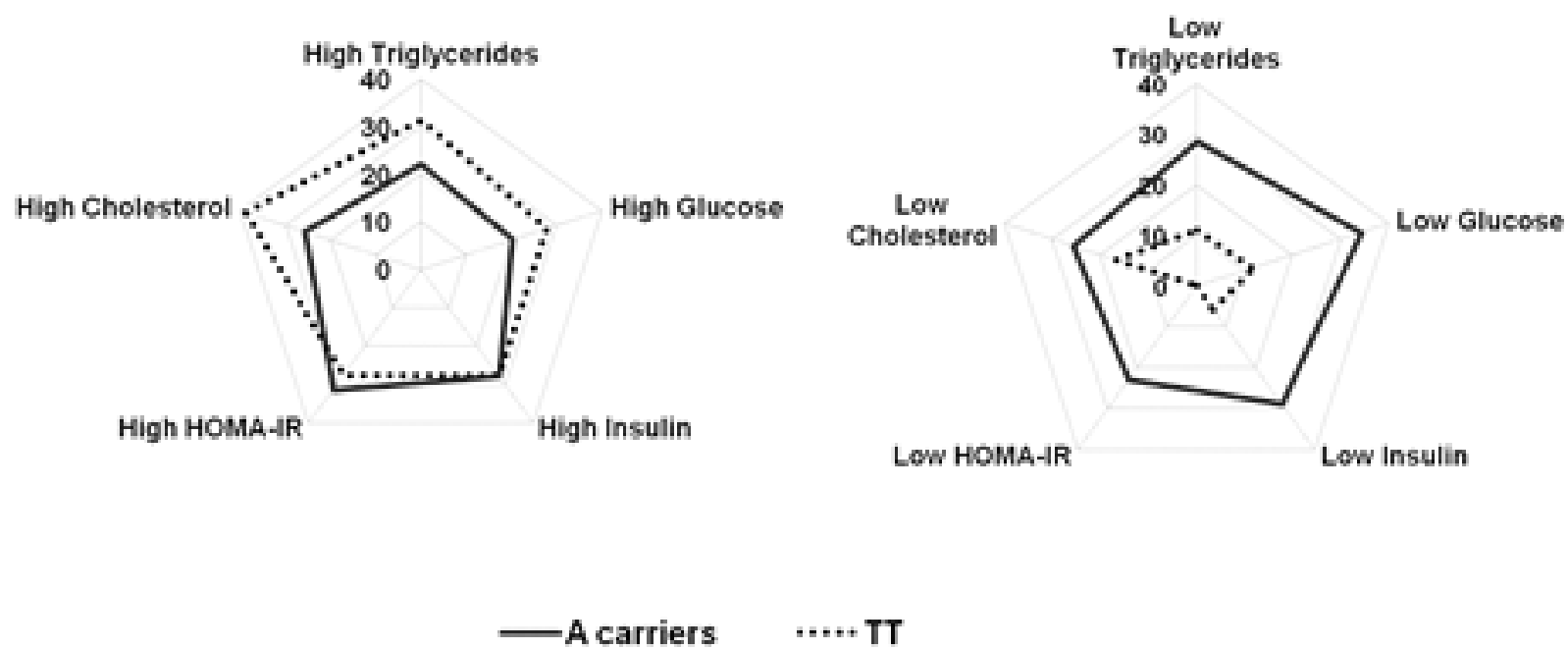


Figure1

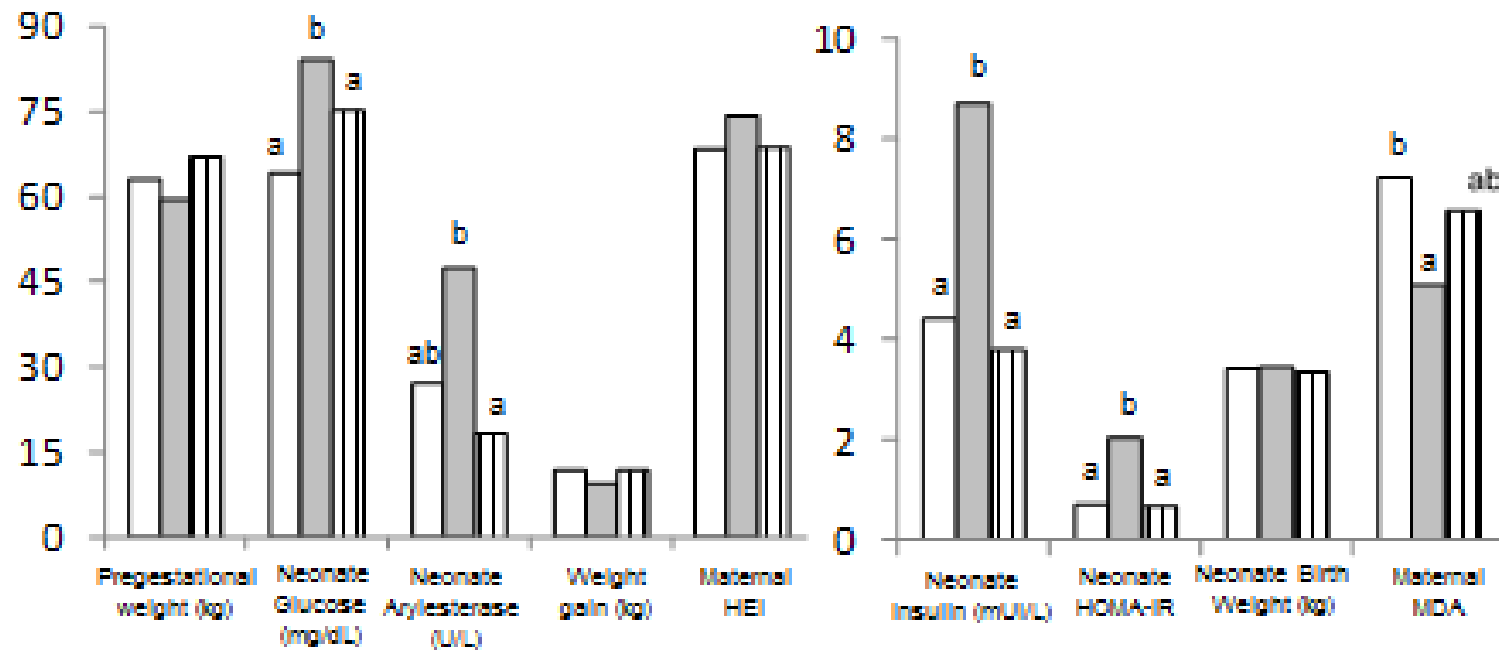


Figure 2

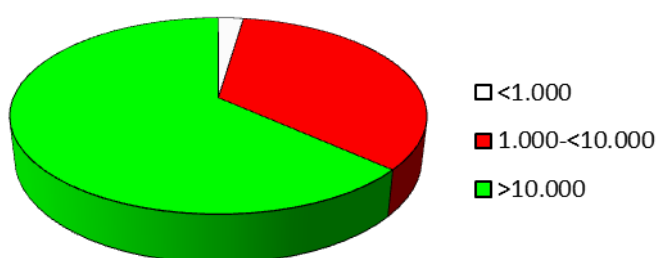
## **5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**





## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como hemos comentado en el apartado de Materiales y Métodos, los neonatos y sus madres que han sido estudiados en la presente memoria de Tesis Doctoral, pertenecían al Área de Mérida, una ciudad extremeña de más de 50.000 habitantes, dotada de un hospital que atiende a unas 158.000 personas. Si bien podría pensarse en una población rural, procedente de aldeas y pequeños pueblos, de las 225 participantes, un 60% de ellas vivían en poblaciones de más de 10.000 habitantes, como Almendralejo, Villafranca de los Barros, o el mismo Mérida, situación que se correspondería con hábitos de vida y de consumo alimentario más propios de un ambiente urbano (Chillón y col., 2011; Grao-Cruces y col., 2013) (Figura 6.1).



**Figura 6.1:** Distribución de las gestantes atendiendo al número de habitantes de la población de residencia.

La Tabla 3.1 resume datos sobre parámetros como la edad gestacional, tipo de parto, distrés fetal, etc., algunos de los cuales condicionan el grado de madurez neonatal. En concreto, el tipo de parto condiciona el distrés fetal y éste, a su vez, la viabilidad del recién nacido, así como la concentración de muchos biomarcadores del metabolismo lipoproteico y de sensibilidad resistencia a la insulina.

Los resultados obtenidos y plasmados en diferentes publicaciones en esta memoria de Tesis Doctoral, señalan claramente la importancia de diferentes aspectos entre los que destacaremos: la calidad de la dieta materna, la tolerancia materna a la glucosa y la influencia de algunos polimorfismos de genes candidatos seleccionados.

## DISCUSIÓN INTEGRADORA

En esta sección pretendemos integrar los resultados ya publicados, considerando en el marco de la gestación y, con las peculiaridades de la muestra estudiada, el papel central de la dieta, de la tolerancia a la glucosa materna, del componente genético, y de las posibles interacciones de estos factores. Con ello, pretendemos también cubrir los objetivos que nos habíamos marcado al inicio de esta memoria.

Nuestro grupo de investigación inició el estudio en recién nacidos en el curso 1979-80 en una investigación que se llamó Estudio Área de Toledo (Bastida, 1992; Perea, 1994), en la que se recogieron datos de un amplio número de neonatos. Esta investigación señaló que parámetros maternos como peso, talla, IMC, presión arterial sistólica y diastólica y consumo de cigarrillos prácticamente no determinaban las concentraciones de glucosa, lípidos, lipoproteínas y Apos en los neonatos. Posteriormente se estudió otro grupo extenso de neonatos en el Estudio “La Serena” (Espárrago, 1997; Espárrago y col., 1999), llegando a resultados similares, en los que las características maternas parecían ejercer poco efecto sobre la mayoría de los parámetros lipoproteicos en los neonatos. Estas conclusiones nos llevaron a considerar que otros factores no necesariamente relacionados con una disminución marcada en el peso del neonato, pueden inducir modificaciones tanto en la madre como en el *conceptus* que se manifiestan como cambios en marcadores intermedios del metabolismo: lipoproteínas, tHcys, insulina, sensibilidad a esta hormona, etc.

Nuestro interés en este tema nos motivó a realizar dos revisiones generales, con la finalidad de actualizar e informar sobre la enorme importancia de la dieta en la fisiología materna, neonatal y de sus anexos (p.e. placenta, líquido amniótico), una en la revista científica *Nutrición Hospitalaria* (2013), órgano de difusión de todas las Sociedades de Nutrición de España (**PUBLICACIÓN 1**), y otra en forma de capítulo llamado “Mediterranean Diet and Pregnancy”, publicado en la Monografía editada por Elsevier sobre Dieta Mediterránea titulada “The Mediterranean Diet. An Evidence-Based Approach” (2015) (**PUBLICACIÓN 2**). No obstante, la importancia de la dieta también se ha manifestado en otras publicaciones, a las que se hará referencia específica en esta sección.

El embarazo es un periodo tremendamente complejo. Desde que ocurre la fecundación hasta el parto, acontecen multitud de procesos que incrementan paulatinamente el número y tamaño de las células, así como su especialización. La confluencia de factores durante la gestación es enorme, pudiendo ésta fracasar o desarrollarse con más o menos éxito. Durante toda la gestación el nuevo ser debe asegurarse un aporte suficiente de nutrientes y de sustancias bioactivas. En la fase embrionaria las demandas no son elevadas, por lo que normalmente el embrión prospera gracias a la disponibilidad de nutrientes intra-útero (Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009; Thompson y col., 2008). De hecho con la excepción de los folatos, la SEN (2008) no modifica las ingestas recomendadas durante la primera mitad de la gestación respecto a una mujer no gestante. Posteriormente, ya en el periodo fetal, existiendo la placenta como órgano activo y en maduración, acontecen algunos ajustes homeorréticos. El feto se constituye como órgano diana en la unidad feto-materna, para promover que la madre cree una “reserva nutricional” que asegure la fase perinatal y la futura lactación, permitiendo

que el nuevo ser se desarrolle hasta alcanzar una masa crítica que predisponga al parto (Florido Navío y col., 2010, Herrera, 1988b). Es por ello que la futura madre debe comer muy adecuadamente, proporcionando un aporte suficiente de nutrientes que asegure la formación placentaria y el crecimiento fetal, asegurando un buen desarrollo de todas las funciones de los mismos. A este respecto la SEN (2008) y otras entidades (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 2006a y 2006b), tienen recomendaciones específicas para energía y nutrientes durante la segunda mitad de la gestación. El Institute of Medicine (2006a, 2006b) aumenta las ingestas recomendadas de todos los nutrientes; no obstante, en el caso de la SEN, existe controversia sobre la necesidad de incrementar diferentes nutrientes como la vitamina A (en forma de retinol) y el hierro, aspecto que se trata en la **PUBLICACIÓN 1**.

En el periodo fetal tienen lugar adaptaciones y ajustes fisiológicos que dan origen a la programación fetal. Es decir, el flujo “normal” de energía y nutrientes hacia el feto condiciona la puesta en marcha de mecanismos que aseguren el crecimiento y la viabilidad en situaciones de aporte limitado. Frente a una disminución en el suministro de alimentos y oxígeno durante la gestación, el neonato tenderá a ser más pequeño como consecuencia de un mecanismo adaptativo llamado “fenotipo ahorrador”.

La información disponible, estudiando la influencia del aporte de energía y nutrientes durante el embarazo sobre el tamaño y peso del recién nacido, y cómo el menor tamaño corporal y de los tejidos condicionan mecanismos y niveles metabólicos es muy abundante (Aerts y col., 1990; Barker, 1999; Álvarez Escolá y Escrivá Pons, 2008; Mataix Verdú y Aranda Ramírez, 2009). Mucho menos conocidos y estudiados son los efectos en gestación de una nutrición ajustada bajo el punto de vista calórico, pero inadecuada respecto a la contribución energética de sus macronutrientes y en particular de la relación AGS/hidratos de carbono. También son poco conocidos los efectos en la gestación de dietas occidentales que se alejan del perfil mediterráneo (**PUBLICACIONES 1 Y 2**).

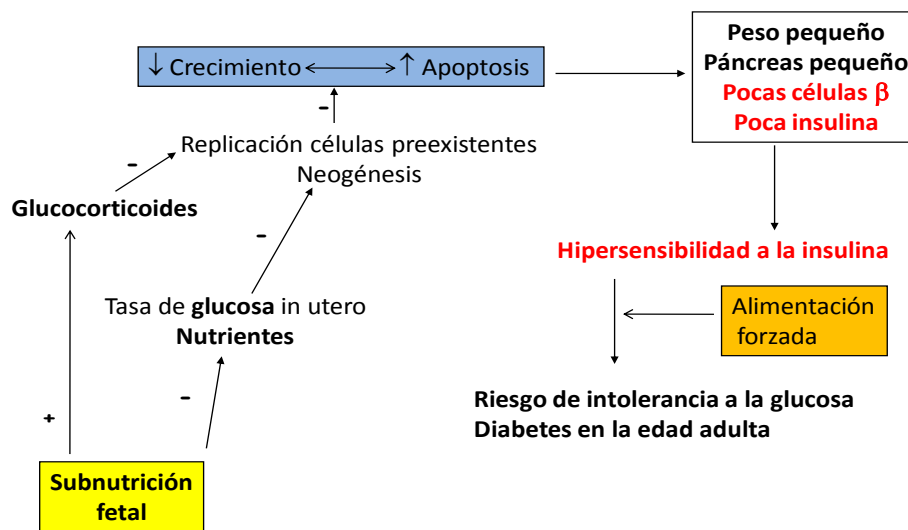
Aunque multitud de componentes de la dieta pueden influir en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos plasmáticos, existe consenso en que el perfil de los AG de la dieta, así como el aporte y calidad de los hidratos de carbono de la misma son factores determinantes (Martín de Santa Olalla y col., 2009). No obstante, en la actualidad se intenta valorar el efecto de la dieta de forma global, habiéndose seleccionado fundamentalmente dos perfiles dietéticos para valorar la calidad de la dieta: El IAS y la ADM. Así, como se trata ampliamente en las dos revisiones que se presentan en esta memoria de Tesis Doctoral (**PUBLICACIONES 1 Y 2**), uno de los aspectos más relevantes del IAS, es la conjunción de factores que definen la calidad de la dieta en base al aporte de alimentos y grupos de alimentos, junto con la variedad y el contenido de sodio, colesterol, y AG. Por su parte, también se señala la utilidad de la ADM para valorar la calidad global de la dieta. Nuestro grupo ha propuesto y utilizado una modificación de la ADM de 14 puntos empleado en el estudio PREDIMED (Estruch y col., 2006). El uso de este índice de ADM de 13 puntos para calificar las dietas de las gestantes constituye, por tanto, una novedad en el campo de las publicaciones de Nutrición.

Actualmente se da la paradoja de que, teniendo la población un poder adquisitivo suficiente, y una enorme variedad de oferta de alimentos diferentes, en términos generales,

coma, de forma incorrecta. La “imperiosa necesidad de no engordar” promovida por los patrones de estética actuales lleva a limitar excesivamente, de forma errónea y sin base científica la ingesta de alimentos, generando patrones de alimentación incorrectos, con el riesgo para la salud que esto implica (Varela-Moreiras y col., 2013; Sánchez-Muniz y Bastida, 2013). La situación es aún más preocupante cuando estos patrones atañen a la gestación: las futuras madres pueden quedar embarazadas en una situación de subnutrición o de nutrición limitada, y se confunde generar reserva grasa con engordar. Además, con gran celeridad en las décadas más recientes, se está rompiendo con aquellos aspectos clave de nuestra alimentación que durante generaciones han sido clave de supervivencia, seguridad y felicidad (Sánchez-Muniz, 2013).

Así, en la **PUBLICACIÓN 1**, se señala la importancia de mantener patrones de dieta tradicional como lo es la Dieta Mediterránea en nuestro caso, que aseguren un consumo correcto y su contribución al total energético de los hidratos de carbono, grasa, AGS, AGP totales y de las familias  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3. Especial mención se hace del papel de diferentes nutrientes en el desarrollo y capacidad secretora de insulina por el páncreas, así como de la hipótesis del “fenotipo ahorrador” de Hales y Barker (2001) (Figura 6.2). Hay que señalar que el páncreas fetal ya produce cantidades relevantes de insulina en la semana 20 del embarazo, y que los cambios hormonales y metabólicos propios, así como los nutricionales, hormonales y metabólicos maternos, pueden afectar tanto a la capacidad secretora de este órgano central, como a la capacidad de las células fetales para responder de manera adecuada y sensible a la insulina. En la **PUBLICACIÓN 2** se definen de forma somera algunos aspectos conocidos y otros menos conocidos sobre la Dieta Mediterránea, los cuales han sido también recientemente divulgados (Preedy y Watson, 2015). Nuestra revisión se centra sobre a) aspectos generales de la nutrición en gestación; b) perfil de Dieta Mediterránea; c) la Dieta Mediterránea como forma para disminuir la malnutrición o la subnutrición durante la gestación; d) la ADM como clave para una buena sensibilidad a la insulina en el neonato; e) la Dieta Mediterránea y el perfil lipoproteico en el recién nacido. Se revisa también, en el marco de una dieta tipo mediterránea, la hipótesis de Palinski y Napoli (2002), que sugiere que el RCV en la prole, incluso en el marco de dietas hipercolesterolemiantes, se reduce cuando se consumen alimentos ricos en antioxidantes. La revisión finaliza demandando estudios sobre la interacción de la adecuación de la dieta con genes candidatos para una mejor comprensión de los efectos positivos de la Dieta Mediterránea.

Todo lo comentado hasta ahora responde nuestro primer objetivo a cubrir: **“Revisar las investigaciones clásicas y los trabajos actuales que señalan a la gestación como época central y crítica, y en particular a la nutrición materna durante este periodo, para el desarrollo de ajustes metabólicos relacionados con la sensibilidad/resistencia a la insulina y RCV y la importancia de la nutrición materna”**.



**Figura 6.2.** Programación hormonal durante el embarazo. Influencia de la subnutrición fetal en el crecimiento y capacidades pancreáticas. Nótese que la falta de glucosa y nutrientes, afecta a la concentración de glucocorticoides y al “flujo” de nuevas células, conduciendo a un menor desarrollo pancreático, afectándose también la producción de insulina. Este proceso se podría compensar aumentando la sensibilidad a la insulina. Cuando en etapas posteriores se dispone de alimentos en gran cantidad, se condicionan mecanismos que podrían conducir a intolerancia a la glucosa y DM. Elaborado a partir de diferentes publicaciones (Reusens y Remacle, 2006; Álvarez Escolá y Escrivá Pons, 2008; Sánchez Muniz y col., 2013a; Gesteiro y col., 2015).

El SM se define como una patología multifactorial donde confluyen e interaccionan diferentes componentes: hiperglucemia, obesidad, dislipemia, y en etapas avanzadas DM2. Un factor predisponente y que une tales componentes es la resistencia a la insulina, que induce a su vez a hiperinsulinismo (Del Prato y col., 2010; Serrano-Ríos y Gutiérrez-Fuentes, 2011). Tanto la dislipemia, la obesidad, como la disminución de sensibilidad a la insulina se inician en edades tempranas (James, 2011; Larson y col., 2011; Ten y Maclaren, 2004), existiendo evidencia de su origen precoz durante la gestación (Gesteiro y col., 2009; Larson y col., 2011).

Aunque existen multitud de publicaciones que relacionan marcadores de resistencia a la insulina con el bajo peso al nacer o más precisamente con el hecho de ser SGA o con DG (Álvarez Escolá y Escrivá Pons, 2008; Larson y col., 2011; Sánchez-Muniz y col., 2013a), muy pocas reportan datos en neonatos con peso normal al nacimiento. No obstante, conviene insistir en que la población neonatal que hemos estudiado respondía en su mayor parte a criterios de normalidad. Queda por tanto, el contexto general de esta Tesis, algo lejos de la hipótesis de Barker (Hales y Barker, 2001) que relaciona el bajo peso al nacer, inducido por gestaciones “limitadas” con el riesgo elevado de padecer enfermedades degenerativas en la edad adulta. Por otra parte, mientras que se han definido puntos de corte para hiperglucemia (Amemiya y col., 2007; Zimmet y col., 2007a, 2007b) y en menor cuantía para hiperinsulinemia en adolescentes y niños (Ten y Maclaren, 2004), pocas publicaciones definen intervalos de

normalidad para estos parámetros en recién nacidos. Por ello en esta Tesis, y con la finalidad de cubrir el objetivo 2.1, **“Establecer los intervalos de normalidad de glucosa, insulina, GH, cortisol, IGF-1, QUICKI, HOMA-IR y HOMA-IS en una población seleccionada de neonatos normopeso, nacidos a término de madres cuya tolerancia a la glucosa no se vio afectada durante el embarazo”**, se presentan los resultados de la **PUBLICACIÓN 3**. En ella se utilizaron criterios muy estrictos para seleccionar a la población neonatal en la que se iban a definir los niveles de normalidad para marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina. Esta selección tan estricta supuso partir de 199 neonatos con sus respectivas madres. Considerando la enorme importancia que la glucemia materna tiene en la glucemia fetal y al nacimiento (Palacín y col., 1984; Serrano García, 2008), y que aproximadamente un 30% de las madres cribadas mediante el test de O’Sullivan resultaron tener alterada la tolerancia a la glucosa, el estudio se realizó finalmente en 115 neonatos.

Estos intervalos de normalidad servirán como puntos de corte que podrán ser empleados en poblaciones neonatales, tanto por nuestro grupo de investigación como en otros estudios. Los resultados obtenidos son pioneros en la bibliografía internacional, ya que recogen datos en población neonatal seleccionada, que si difieren de los encontrados en otras publicaciones, es porque estas últimas presentan datos de niños prematuros, con peso insuficiente o elevado y cuyas madres sufrían de DG, sobrepeso/obesidad, etc. Así los niveles de cortisolemia al nacimiento en nuestra población fueron menores que en otros estudios (Kirimi y col., 2000; Christou y col., 2001) muy probablemente por la exigencia en nuestro caso de seleccionar neonatos con valores en el índice de Apgar muy elevados, que denotaban ausencia de distrés fetal.

Aunque en los percentiles de algunos parámetros existen diferencias aparentes debidas al sexo, las distribuciones no fueron significativamente distintas entre niños y niñas. No obstante, el mayor peso en los niños y las hormonas sexuales, deben jugar un papel en tales diferencias, con niveles de insulinemia y de HOMA-IR que tendieron a ser algo más elevados en las niñas. De hecho, la prevalencia de niveles de insulina  $<3 \mu\text{UI/mL}$  fue algo más elevada en niños que en niñas (55% vs. 33%), aunque la prevalencia de hiperinsulinemia (insulina  $\geq 15 \mu\text{UI/mL}$ ) (Ten y Maclaren, 2004) fue similar en ambos géneros (9,3% vs. 9,8%).

También se reportan datos de normalidad para la relación glucosa/insulina, GH, IGF-1, e insulina/cortisol. Dadas las características antropométricas de la población seleccionada, los intervalos de GH e IGF-1 pueden considerarse de normalidad para la población de neonatos de raza caucasoide nacidos en España. Igualmente, la ausencia de distrés fetal sugiere que los intervalos de cortisolemia obtenidos pueden utilizarse para definir normalidad en la población neonatal. El cociente insulina/cortisol se reduce en situaciones de desnutrición y de estrés (Bowie, 1964; Torún y Chew, 1994; Bleicher y col., 2002), con lo que la selección utilizada garantizaría los intervalos de normalidad encontrados para este cociente.

La segunda parte del objetivo relativo a niveles de referencia (objetivo 2.2) se ocupa de los parámetros del metabolismo lipoproteico: **“Establecer los intervalos de normalidad para diferentes lipoproteínas (LDL, HDL, VLDL, Lp(a), LDLox, AE y tHcys en una población seleccionada de neonatos normopeso, nacidos a término”**.

La **PUBLICACIÓN 4**, de forma similar a la **PUBLICACIÓN 3**, ya comentada para el metabolismo de la glucosa, define parámetros de normalidad lipoproteica en un total de 197 neonatos seleccionados (87 niños y 110 niñas).

Tal como se indicó con anterioridad en la Revisión Bibliográfica (Sección 1) existe evidencia de la utilidad del cribado neonatal de CT o de lipoproteínas para localizar futuros candidatos a sufrir hipercolesterolemia o dislipemia, así como para identificar padres dislipémicos asintomáticos (Bastida y col., 2007).

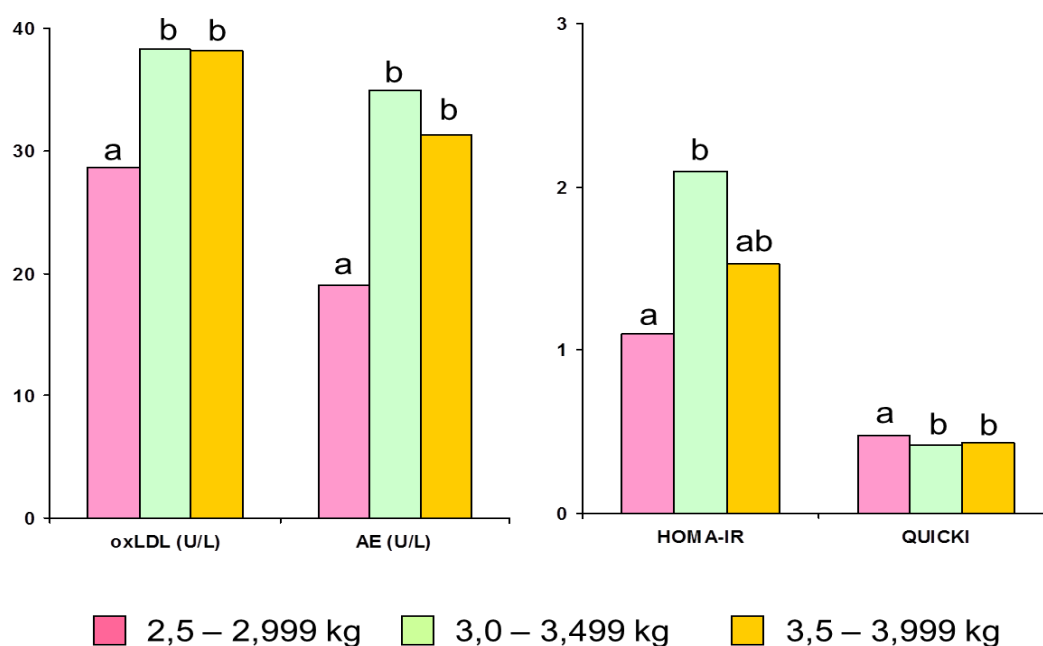
La determinación de LDLc, HDLc, Apo A1 y Apo B ó de los cocientes CT/HDL, LDL/HDL, Apo A1/Apo B parecen aún más discriminantes que la de sólo CT (Srinivasan y Berenson, 1995; Juonala y col., 2008; Iughetti y col., 2010), aunque prácticamente no se han utilizado en neonatos (Bastida y col., 1996a; Sánchez-Muniz y col., 1994). Menor aún es la información disponible al nacimiento de otros marcadores como LDLox, AE, tHcys, Lp(a).

Como en otros estudios el peso corporal y el IMC tendió a ser mayor en niños que en niñas (Bastida, 1992; Perea, 1994; Espárrago, 1997). Las niñas presentaron niveles más elevados de CT, HDLc (Sánchez-Muniz y col., 1994; Pardo y col., 2005; Badiie y Kelishadi, 2008) y Apo A1 (Bastida y col., 1996a; Casanueva y col., 1998). A su vez, los niveles de Lp(a) también fueron más elevados en las niñas, sugiriendo un papel central de las hormonas femeninas en el metabolismo lipoproteico, aunque otros trabajos realizados en un número mucho menor de recién nacidos no encuentran diferencias significativas para la media o mediana de la Lp(a) (Badiie y Kelishadi, 2008; Casanueva y col., 1998).

A pesar de que todos los niños seleccionados eran normopeso, observamos una relación muy interesante entre el peso corporal y algunos factores metabólicos y de resistencia a la insulina (Figura 6.3). Así los niños entre 2,5 y 2,99 kg presentaron menores IMC e IP que aquellos con peso al nacimiento entre 3 y 4 kg, lo que sugiere una disminución simétrica del tamaño. Estos niños con menor peso (aún dentro de la normalidad ponderal) presentaron también marcadores de actividad lipoproteica más reducidos (p.e. LDLox y AE) (Figura 6.3), posiblemente en relación con una mayor sensibilidad a la insulina y con una captación más eficiente por las células corporales fetales de las lipoproteínas para la utilización del colesterol que transportan (Larqué y col., 2013).

Utilizando los criterios de normalidad de glucosa de la **PUBLICACIÓN 3** y los de TG y HDLc sugeridos en la **PUBLICACIÓN 4**, nuestro grupo ha definido por primera vez en bibliografía internacional (Gesteiro y col., 2013) la conjunción de dos factores de riesgo de SM: disglucemia y dislipemia (en forma de HDLc disminuido ó de TG elevados) para responder a nuestro tercer objetivo: **“Analizar el efecto de la concurrencia de dos componentes principales de SM (hiperglucemia/hipertrigliceridemia, hiperglucemia/HDLc disminuido) sobre marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina en sangre de cordón.”**

Un 6,6% de los neonatos presentaban elevados tanto los niveles de glucosa como los de TG, mientras que el 2,5% tuvieron elevada la glucemia y niveles reducidos de HDLc.

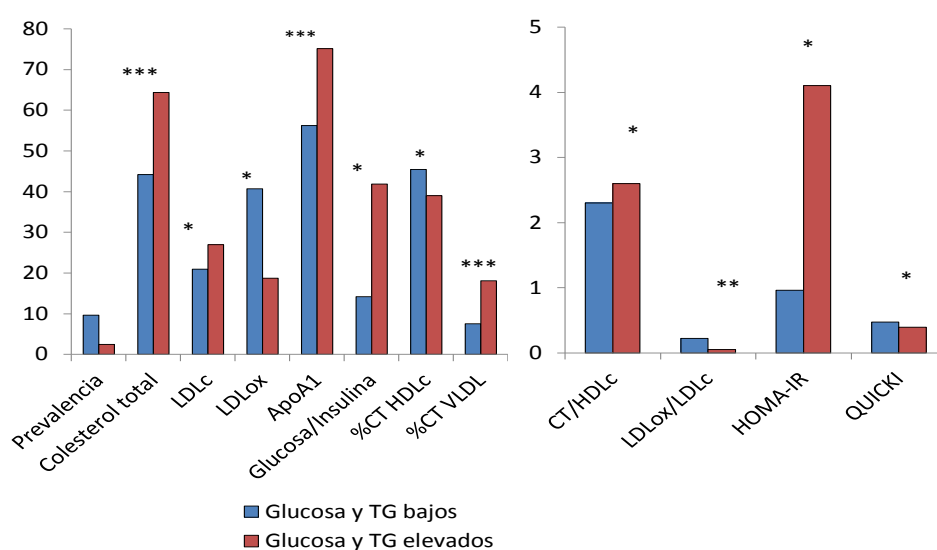


**Figura 6.3.** Asociación del peso corporal (jerarquizado en escalas de 500 g) con algunos marcadores metabólicos. Los resultados en todos los parámetros fueron significativos (ANOVA  $P < 0,05$ ). Las barras con distintas letras fueron significativamente diferentes. AE: arilesterasa, HOMA-IR: *Homeostatic model assessment-insulin resistance*, oxLDL: LDL oxidadas, QUICKI: *Quantitative insulin check index*.

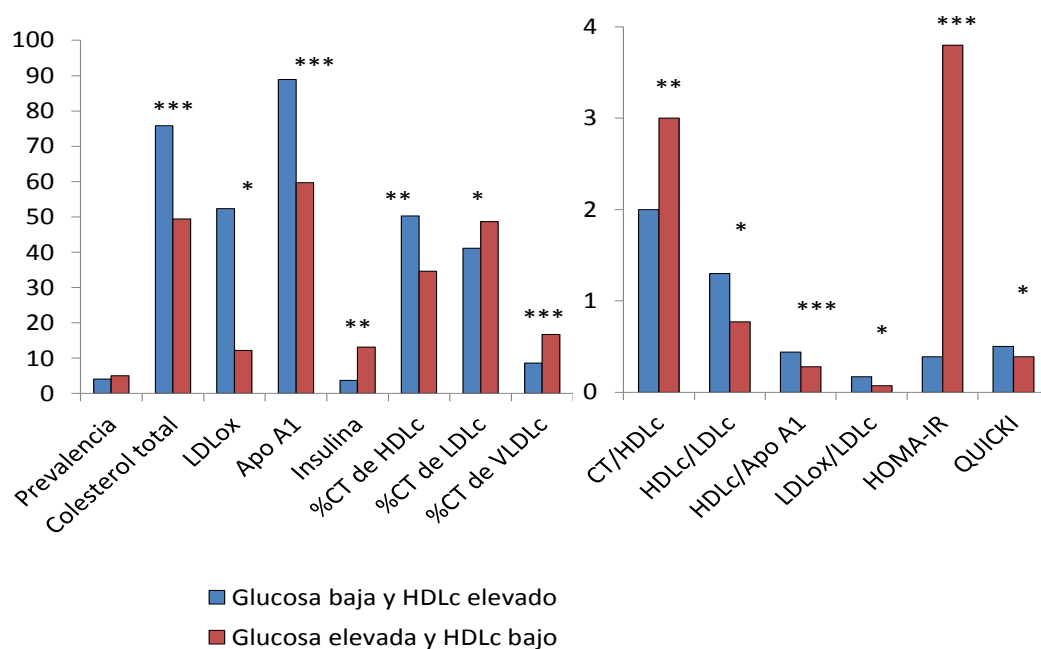
La concurrencia de niveles elevados de glucosa y TG afectó negativamente al perfil lipoproteico, HOMA-IR, QUICKI y cociente glucosa/insulina respecto a aquellos con bajos niveles de glucemia y TG. Los neonatos con altos niveles de glucemia y bajos de HDLc también tuvieron afectados negativamente algunos marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina (Figuras 6.4 y 6.5).

No obstante, dado el número relativamente pequeño de recién nacidos que presentaban tal conjunción de factores, se sugería cautela a la hora de interpretar los datos y se señalaba la importancia de realizar estudios de seguimiento de factores de riesgo en la misma población y de ampliar el estudio con un mayor número de neonatos.





**Figura 6.4.** Efectos de la concurrencia de glucosa y triglicéridos elevados sobre diferentes parámetros lipoproteicos y de sensibilidad/resistencia a la insulina. CT: colesterol total. HDLc: colesterol transportado por HDL, HOMA-IR: *Homeostatic model assessment-insulin resistance*, LDLc: colesterol transportado por LDL, LDLox: LDL oxidadas, QUICKI: *Quantitative insulin check index*.



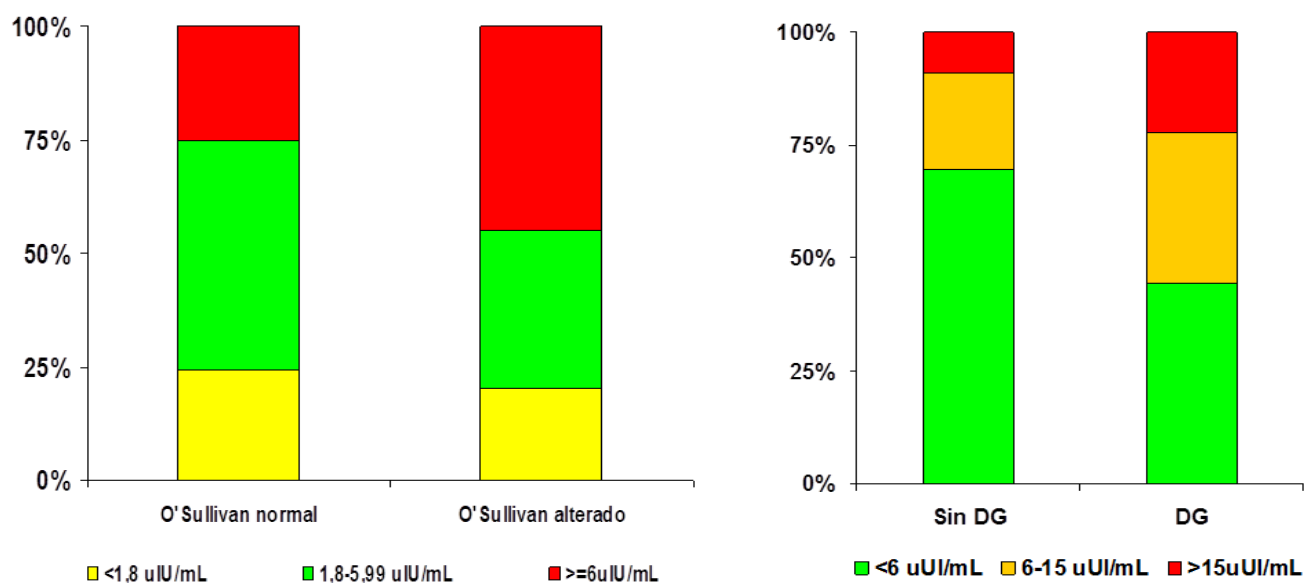
**Figura 6.5.** Efectos de la concurrencia de glucosa elevada con HDLc bajo sobre diferentes parámetros lipoproteicos y de sensibilidad/resistencia a la insulina. CT: colesterol total, HDLc: colesterol transportado por HDL, HOMA-IR: *Homeostatic model assessment-insulin resistance*, LDLc: colesterol transportado por LDL, LDLox: LDL oxidadas, QUICKI: *Quantitative insulin check index*, VLDLc: colesterol transportado por VLDL.

Los objetivos 4 y 5 se centran en **“Determinar la influencia del grado de tolerancia a la glucosa de la madre durante el embarazo sobre los niveles de marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina de los neonatos”** y **“Encontrar la posible interacción entre la hipo o hiperinsulinemia de los recién nacidos y el grado de afectación de la tolerancia a la glucosa de sus madres durante el embarazo”**.

Con la finalidad de responder a tales objetivos se estudiaron un total de 176 neonatos seleccionados cuyas madres fueron cribadas para DG durante el embarazo. Los resultados se recogen en la **PUBLICACIÓN 5**. Durante el embarazo tienen lugar modificaciones y adaptaciones hormonales que aseguran un metabolismo de la glucosa adecuado y la supervivencia y crecimiento del feto (Beardsall y Dunger, 2007). Los efectos de la reducción de la tolerancia a la glucosa materna sobre la resistencia a la insulina neonatal han sido poco estudiados y en la mayoría de los casos se refieren a DG, no existiendo apenas información en población neonatal de madres sin alteraciones de la tolerancia a la glucosa. El trabajo que se presenta estudió por primera vez en neonatos españoles la sensibilidad a la insulina mediante el índice QUICKI. A su vez, se hipotetizó que la hiperinsulinemia al nacimiento, incluso en neonatos normopeso, es causada por la resistencia a la insulina durante la gestación y que esta circunstancia se agrava cuando existe intolerancia a la glucosa asociada. De los 176 neonatos estudiados, 56 tenían niveles por encima de 6  $\mu\text{UI/mL}$ , mientras que 33 presentaron niveles inferiores a 1,8  $\mu\text{UI/mL}$ , niveles ambos considerados como puntos de corte para hiperinsulinemia e hipoinsulinemia (**PUBLICACIÓN 3**). Casi el 10% de los neonatos tuvieron niveles  $>15 \mu\text{UI/mL}$  (Ten y Maclaren, 2004). Los resultados sugieren que el incremento de la insulinemia neonatal no fue capaz de normalizar la glucemia en los neonatos del cuartil más alto para la insulina. Además, 6 de cada 7 neonatos con insulina elevada tuvieron el HOMA-IR por encima del  $P_{75}$ .

Sesenta madres de las 176 presentaron alteraciones en la tolerancia a la glucosa, dando resultado positivo en el test de O’Sullivan, y 9 fueron diagnosticadas de DG (Figura 3.3). La tolerancia a la glucosa materna afectó a marcadores de la sensibilidad/resistencia a la insulina neonatal. De hecho, se encontraron más neonatos con insulina  $>6 \mu\text{UI/mL}$  cuando las madres tuvieron alterada la tolerancia a la glucosa. Igualmente, el porcentaje de niños con insulina  $>15 \mu\text{UI/mL}$  y entre 6 y  $<15 \mu\text{UI/mL}$  fue mayor en madres diagnosticadas de DG (Figura 6.6).

Uno de los aspectos más relevantes y quizá más paradójicos de esta publicación son los resultados que comparaban los resultados de niños pertenecientes al Q1 o al Q4 atendiendo a los niveles de insulina cuyas madres eran tolerantes o no a la glucosa. En el grupo Q1, 7 madres vieron afectada su tolerancia a la glucosa, mientras que 26 la mantuvieron normal. En el grupo Q4, 27 madres vieron afectada su tolerancia a la glucosa y 29 la mantuvieron normal. Con la excepción de la edad y la glucosa maternas, no se encontraron diferencias significativas para ningún parámetro antropométrico o marcador de resistencia a la insulina cuando se compararon datos en los niños Q1 ni en los Q4 cuyas madres tuvieron alterada o no la tolerancia a la glucosa.



**Figura 6.6.** Distribución de la insulinemia neonatal en función de la tolerancia a la glucosa materna. DG: diabetes gestacional.

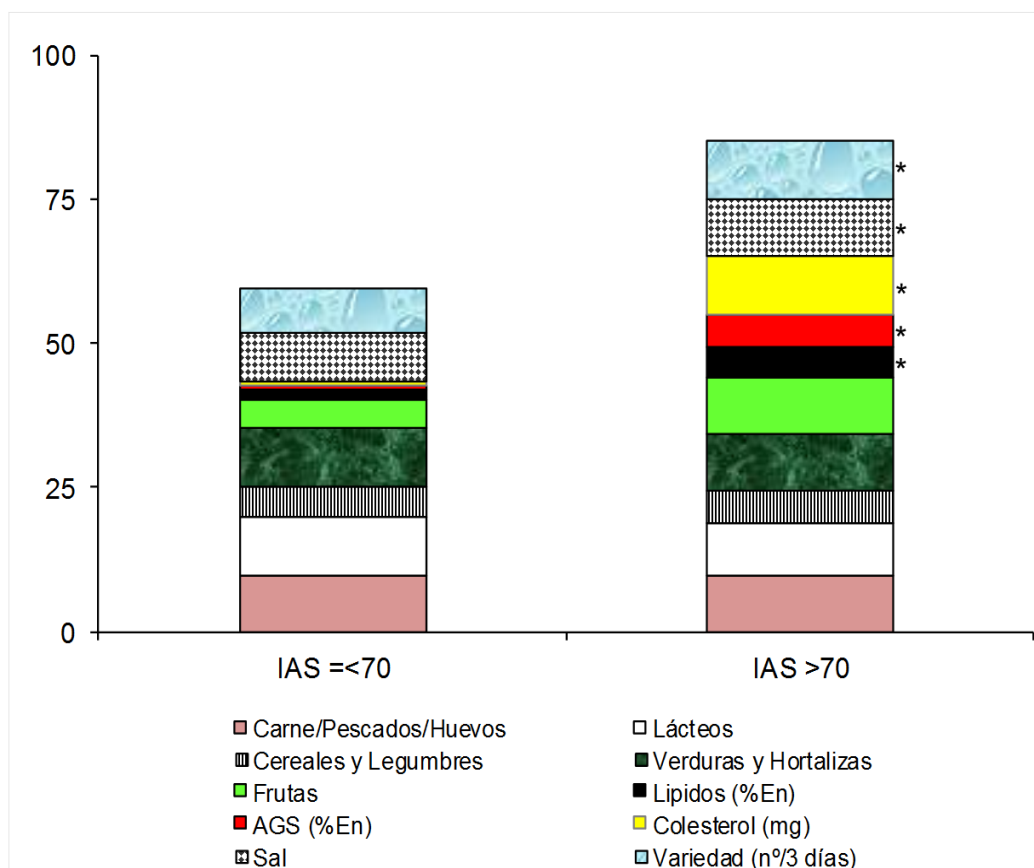
La dieta materna es uno de los temas a los que más atención hemos prestado en nuestro estudio. Por ello, entre los objetivos fundamentales de esta Tesis, además de revisar la dieta en el embarazo (objetivo 1), nos hemos marcado otros dos: **“Conocer la calidad de la dieta de las gestantes durante el embarazo y su influencia sobre la glucemia y la colesterolemia maternas”** y **“Determinar la influencia de la calidad de la dieta materna durante el embarazo sobre los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina, y las concentraciones de homocisteína, arilesterasa, lípidos y lipoproteínas en sangre de cordón al nacimiento”**.

Estos dos objetivos se han cubierto estudiando las características de la dieta de gestantes del Estudio Mérida que completaron una doble encuesta al final del primer trimestre y después de la gestación. Si bien la información nutricional durante el primer trimestre fue disponible en un número de mujeres relativamente elevado, posteriormente no fue posible completarla, por lo que sólo se estudió la dieta de forma detallada en 35 de ellas. Los resultados más relevantes se han plasmado en las **PUBLICACIONES 6 y 7**. Estos trabajos señalan que la dieta de las gestantes estudiadas presenta las mismas características y limitaciones que la de otras mujeres en España (Serra-Majem y col., 2003b; AESAN, 2011). Se puede afirmar que la contribución energética fue excesiva para lípidos y AGS (FAO/OMS, 2010) y reducida para de hidratos de carbono (Ruiz-Roso Calvo de Mora, 2013). Otros parámetros como el aporte de algunas vitaminas fueron deficientes, aunque muchas de las participantes recibieron suplementos dietéticos.

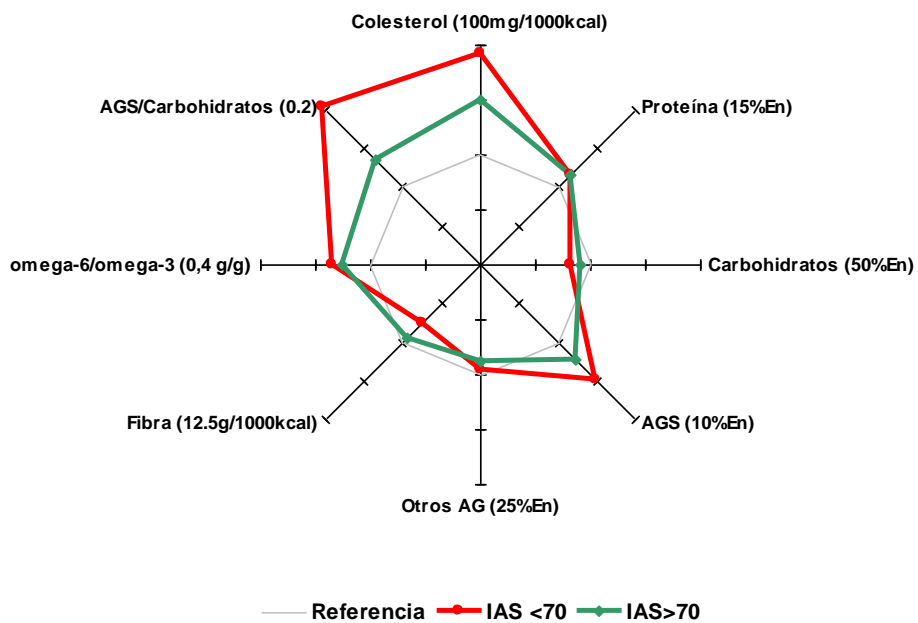
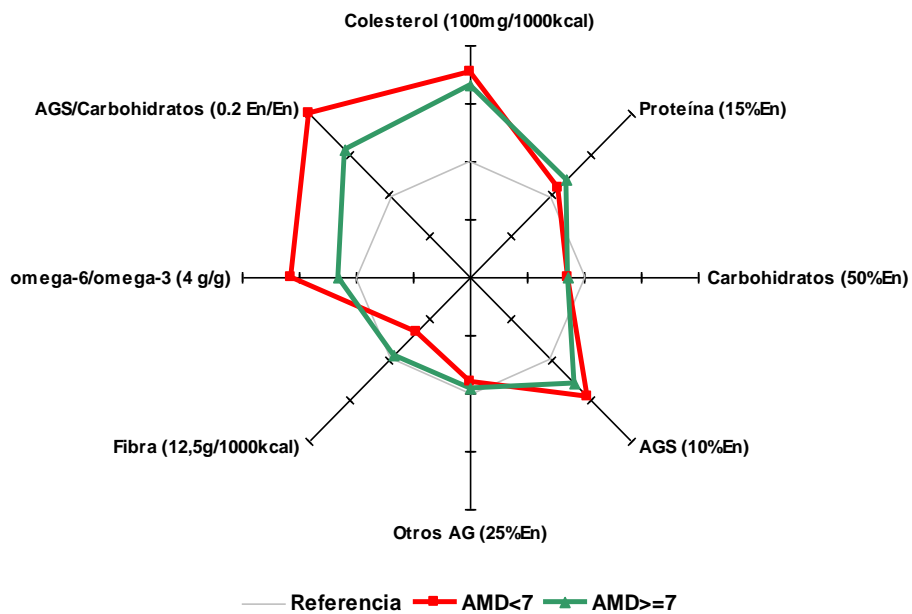
Las futuras madres siguieron dietas con algunas características de Dieta Mediterránea. Así, todas ellas contenían aceite de oliva como principal aceite culinario, pero también una alta contribución de carne y derivados, moderada de legumbres y cereales, y aceptable de frutas y verduras. La media del IAS fue algo menor que el punto de corte 70, sugerido por algunos

autores como aceptable (Norte Navarro y Ortiz Moncada, 2011). Alrededor de un 37% de las madres seguía dietas con una puntuación de ADM <7.

Cuando las madres se clasificaron atendiendo a la calidad de sus dietas en  $IAS \leq 70$  ó  $>70$ , ó ADM <7 ó  $\geq 7$ , se observaron diferencias muy interesantes en el contenido y contribución de los componentes de las dietas. Las dietas con peor calidad según los indicadores IAS y ADM, señalan un enriquecimiento en grasas, colesterol y AGS, y un empobrecimiento en hidratos de carbono y fibra dietética (Figuras 6.7 y 6.8). También se analizó la posible presencia de factores confundentes, no encontrándose efectos significativos de la estacionalidad, cambios en los hábitos dietéticos y otros aspectos maternos sobre la distribución de las madres en los 2 grupos para IAS ó ADM. También las dietas con baja puntuación ADM tuvieron un alto índice aterogénico, contenían menos folatos y tuvieron un menor cociente  $(AGP+AGM)/AGS$ , y mayor cociente  $AGS/\text{hidratos de carbono}$  y  $AGP \omega-6/AGP \omega-3$  que las dietas con alta puntuación.

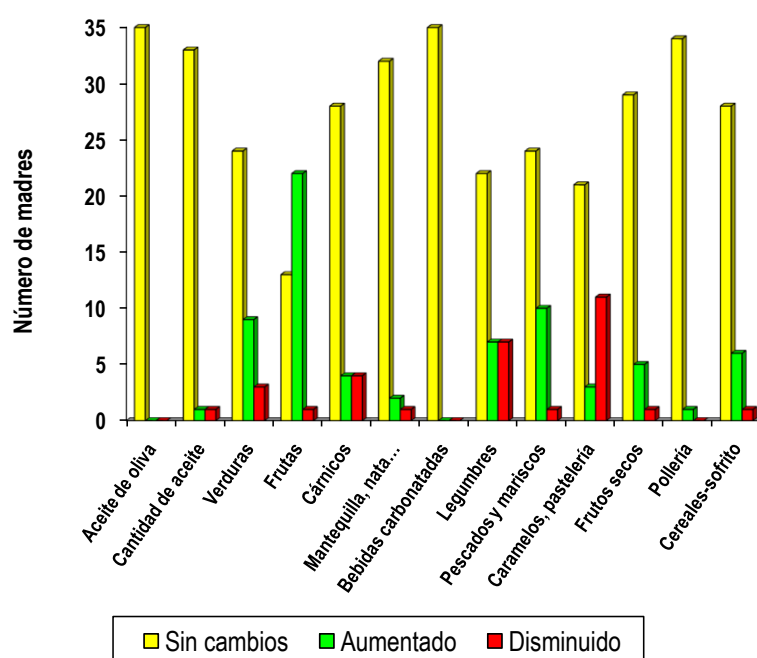


**Figura 6.7.** Puntuación de los diferentes componentes que se evalúan en el índice de alimentación saludable (IAS) durante la gestación en función de la calidad de la dieta ( $IAS \leq 70$  frente a  $IAS > 70$ ).



**Figura 6.8.** Diagramas de la calidad de la dieta durante el embarazo en el primer trimestre según la puntuación de adherencia a Dieta Mediterránea (ADM) (A) ó índice de alimentación saludable (IAS) (B)  
 \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Se observó que los hábitos nutricionales son muy estables durante la gestación, lo que implica que la calidad de la dieta prácticamente no cambia entre el primer trimestre y el resto de la gestación (Figura 6.9 y Tabla 6.1). Ya decía D. Francisco Grande Covián que “es más difícil cambiar de hábitos nutricionales que de religión”. Respecto a la ADM, se encontró que ninguna de las mujeres modificó el tipo de aceite culinario, que siempre fue aceite de oliva. No obstante, sí se observó una tendencia a incrementar el consumo de frutas, vegetales y pescados, aunque esto no incidió significativamente en la valoración de la ADM, ya que de un valor medio de 6,8 en el primer trimestre pasaron a 7,0 en la última parte de la gestación. Igualmente, los índices que valoran la aterogenicidad o la trombogenicidad de la dieta no se modificaron. En ningún caso aquellas madres con ADM <7 en el primer trimestre de gestación aparecían en el grupo de mayor adherencia en la fase final del embarazo o viceversa.



**Figura 6.9.** Cambios en la ADM observados entre el primer trimestre y la etapa final del embarazo.

**Tabla 6.1.** Cambios en la calidad de la dieta durante el embarazo atendiendo a la adherencia a la Dieta Mediterránea (ADM). DS: desviación estándar.

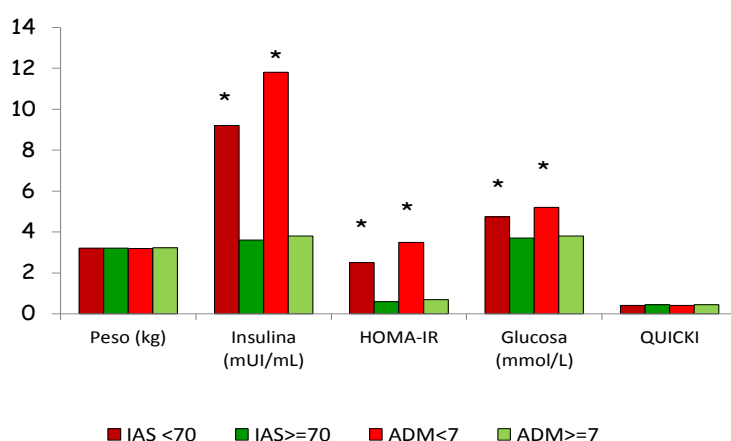
Dieta maternal	Media	DE	Intervalo
ADM, primer trimestre	6,8	1,6	4-9
ADM, final de la gestación	7,0	1,6	4-10

En la **PUBLICACIÓN 6** se muestra que las madres con dietas adecuadas en base a los dos índices de calidad empleados, presentan valores de glucosa basal significativamente mayores, aunque siempre dentro de la normalidad, debido probablemente, al mejor cociente AGS/hidratos de carbono de la dieta en estas madres. Las dietas con menor cociente AGS/hidratos de carbono determinan un menor HOMA-IR (Cabello-Saavedra y col., 2010; Smith y col., 2012), y una menor tolerancia a la glucosa en individuos que consumen mayor cantidad de AGS (Vessby y col., 1980, 2001), lo que supone una mayor cantidad de glucosa circulante disponible para el feto. En el embarazo se produce un aumento fisiológico de la colesterolemia (Ywaskewycz Benítez y col., 2010), y aunque no hay un efecto significativo de la ADM sobre el CT materno en nuestro estudio, en la **PUBLICACIÓN 7** sí señalamos que las madres con peor puntuación en ADM tuvieron el CT un 5% más elevado que las que tenían una dieta adecuada. Entre los factores que podrían explicar esta situación se encuentran la mejor relación AGS/hidratos de carbono y el aporte de fibra (Sánchez-Muniz y col., 2013b).

Para cubrir el Segundo de los objetivos que nos ocupa, se han realizado varios estudios (**PUBLICACIONES 6 y 7**), que analizan la influencia de la calidad de la dieta materna sobre los parámetros del metabolismo lipoproteico y de la glucosa del recién nacido.

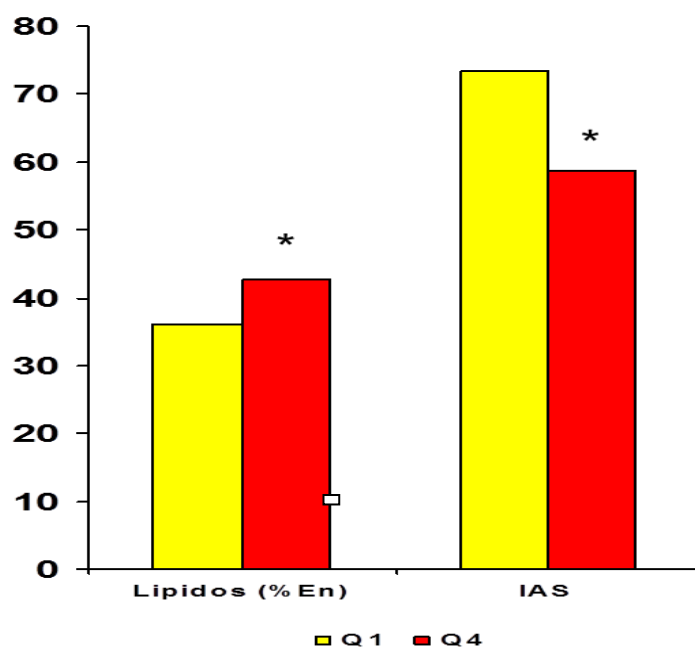
La calidad y cantidad de la dieta materna durante la gestación tiene una clara incidencia no sólo en el desarrollo fetal, sino también en los niveles de insulina y glucosa y de sensibilidad a la insulina con los que nacerá su hijo (Figura 6.2). También, parece importante regulando al nacimiento marcadores de RCV. Si como se definió en la Revisión Bibliográfica, el colesterol se constituye como molécula imprescindible para la división celular y el desarrollo (Chen y col., 1975 citado por Lasunción y col., 2000; Larqué y col., 2013), no parece descabellado pensar que los niveles elevados de LDLc y CT en los niños SGA sea un mecanismo adaptativo para asegurar aporte de colesterol a los tejidos y con ello “impulsar” el crecimiento. No obstante esta programación fetal del metabolismo de colesterol tendría el doble filo de inducir un mayor RCV, ya que, al incremento de la síntesis se uniría, tras el nacimiento, un aporte exógeno de colesterol y componentes nutricionales pro-colesterogénicos propios de la alimentación occidental actual.

Tanto la insulinemia como los valores del HOMA-IR estuvieron inversamente correlacionados con la puntuación del IAS ( $P=0,031$  y  $P=0,032$ , respectivamente) y con la de la ADM ( $P=0,048$  y  $P=0,047$ , respectivamente). Después de ajustar los datos a 1.000 kcal se observaron correlaciones positivas entre el colesterol de la dieta materna y la glucemia neonatal ( $P<0,001$ ), insulinemia ( $P=0,010$ ), y HOMA-IR ( $P=0,008$ ). El consumo de grasa se correlacionó positivamente con la glucemia neonatal ( $P=0,035$ ), pero inversamente con los datos del QUICKI ( $P=0,034$ ). Estos datos sugieren de forma determinante que la dieta materna puede además condicionar muchos marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina (Figura 6.10).



**Figura 6.10.** Calidad de la dieta y marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina. \* $P < 0,05$ .

En la **PUBLICACIÓN 5**, se señalaba que las madres de los neonatos del cuartil más bajo de insulinemia siguieron dietas más correctas que aquellas cuyos hijos pertenecían al cuartil más alto (Figura 6.11).



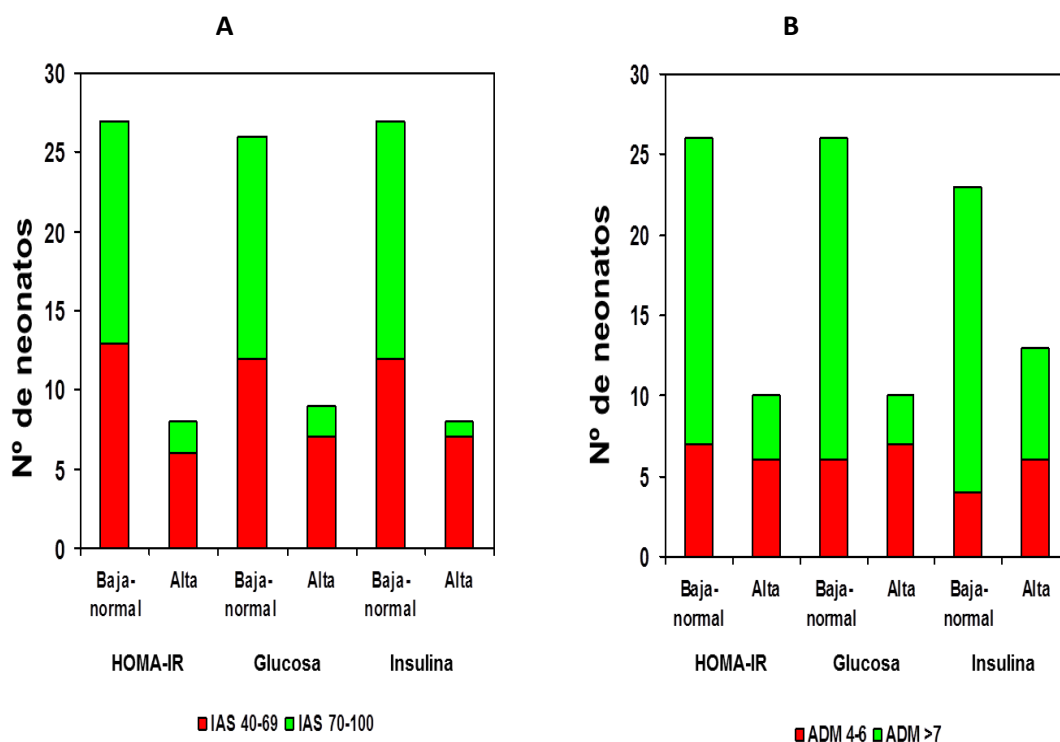
**Figura 6.11.** Comparación de la contribución energética de los lípidos e índice de alimentación saludable (IAS) de las dietas maternas atendiendo a la insulinemia de sus hijos al nacimiento. Q1 y Q4 corresponden a los neonatos dentro del cuartil 1 y 4 de insulina, respectivamente.

Un alto porcentaje de neonatos cuyas madres consumían dietas con baja puntuación para el IAS y la ADM presentaron altos niveles de insulina, glucosa y HOMA-IR. Comparados con los del grupo de IAS adecuado, los neonatos pertenecientes al grupo inadecuado presentaron un



riesgo relativo de 6,7 ( $P = 0,017$ ) de presentar hiperinsulinemia, 7,6 ( $P = 0,008$ ) de hiperglucemia, y 2,9 ( $P = 0,103$ ) de altos valores de HOMA-IR (Figura 6.12.A). En comparación con los neonatos cuyas madres presentaron  $ADM \geq 7$ , los del grupo  $ADM < 7$  tuvieron riesgos relativos de 2,1 ( $P = 0,177$ ) para hiperinsulinemia, 3,9 ( $P = 0,016$ ) para hiperglucemia, y 3,4 ( $P = 0,043$ ) para HOMA-IR elevado (Figura 6.12.B). Estos datos sugieren que la puntuación del IAS predice mejor la influencia de la dieta durante la gestación sobre la sensibilidad/resistencia a la insulina al nacimiento que la puntuación de la ADM.

Los resultados obtenidos sugieren ampliamente el papel de la dieta materna en el riesgo de dislipemia al nacimiento, así como de otros factores de RCV, tales como los niveles incrementados de tHcys. Esta relación se estudió sólo con el indicador ADM, ya que el IAS incluye como puntuación positiva alimentos de origen animal con elevado contenido de colesterol y grasa saturada (huevos, leche, carnes) y no considera como negativo el consumo de productos de pastelería industrial. No obstante, el IAS corregiría en parte este aspecto negativo, pues contabiliza el consumo de AGS, colesterol y sodio entre otros.



**Figura 6.12.** Número de neonatos con niveles normales-bajos y elevados de insulina en sangre de cordón, glucosa y HOMA-IR. A. Según la puntuación de la dieta materna atendiendo al índice de alimentación saludable (IAS). B. Según la puntuación de la dieta materna atendiendo a la adherencia a Dieta Mediterránea (ADM).

Las madres con dietas de peor calidad dieron a luz neonatos con mayores niveles de LDLc ( $P = 0,049$ ), Apo B ( $P = 0,040$ ), tHcys ( $P = 0,026$ ) y cociente Apo A1/Apo B ( $P = 0,024$ ), aspectos que parecen relacionados con el mayor índice aterogénico de estas dietas, ya que el perfil lipoproteico del neonato depende en gran parte de la transferencia placentaria de lípidos maternos (Herrera y col., 2006a; Gil Sánchez y col., 2012). Los resultados son relevantes, ya

que según los datos del Estudio Área de Toledo, el perfil lipoproteico de los niños a los 4 (Bastida y col., 2007) y a los 16 años (Martínez Sesmero, 2012) era reflejo de los datos obtenidos al nacimiento.

El porcentaje de recién nacidos con niveles elevados de tHcys, Apo B, y LDLc, y bajos de ApoA1/ApoB, fue mayor en el grupo de baja calidad de la dieta que en el de mayor ADM. Nuestros datos entroncan claramente en lo ya sugerido por Palinski y Napoli (2002) y el estudio FELIC (Napoli y col., 1999) respecto a las ventajas de una dieta rica en antioxidantes, como la mediterránea, ralentizando la formación de ateromas y reduciendo su severidad durante la infancia. No debe olvidarse que existe evidencia de la existencia de “tracking” de diferentes marcadores de riesgo desde la edad pediátrica hasta la edad adulta (Aasvee y col., 2004).

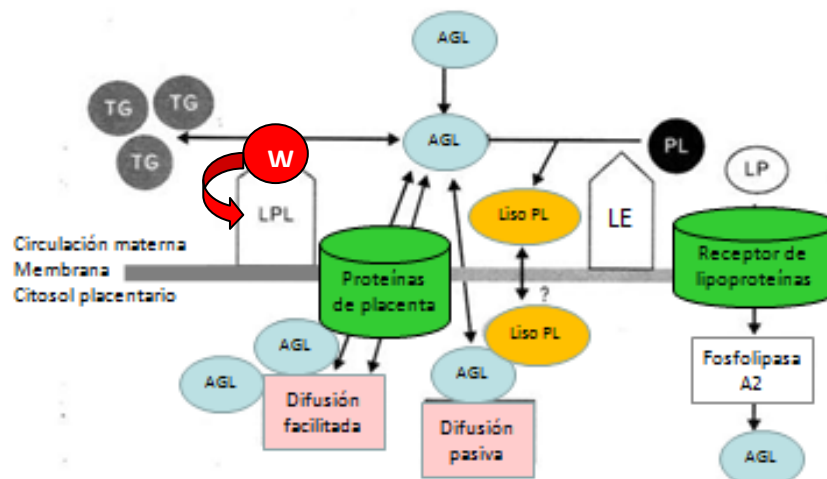
Todo el desarrollo de esta memoria de Tesis Doctoral versa sobre la importancia de diferentes aspectos en los marcadores de RCV y SM de los neonatos. Hasta el momento hemos tratado la calidad de la dieta materna y aspectos metabólicos de la madre como la tolerancia a la glucosa. No podemos olvidarnos de la influencia que algunos polimorfismos en algunos genes candidatos, tanto en las madres como en los propios neonatos, ejercen sobre estos marcadores, y de aquí surgen nuestros objetivos en el ámbito de la genética: **“Estudiar el efecto de los polimorfismos S19W del gen candidato APOA5 de las madres y de los neonatos sobre parámetros antropométricos, marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina al nacimiento”**.

La Apo A5 es una lipoproteína implicada en la activación de la LPL y el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG (Figura 1.9). La LPL juega un papel principal en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG, y se sabe que la actividad LPL de la placenta correlaciona positivamente con los depósitos de grasa en el feto y su tamaño (Magnusson-Olsson y col., 2006). En la **PUBLICACIÓN 8** estudiamos la asociación entre el polimorfismo S19W del gen APOA5 y las medidas antropométricas, concentraciones de lipoproteínas y hormonas, y sensibilidad a la insulina en 58 neonatos seleccionados de la cohorte de Mérida. Los neonatos portadores del alelo W mostraron menor IMC, IP (ambos  $P < 0,001$ ), peso ( $P < 0,01$ ), insulinemia, cociente insulina/cortisol, HOMA-IR y concentración de Apo B (todos  $P < 0,05$ ), y mayor concentración de LDLox y cociente LDLox/LDL (ambos  $P < 0,05$ ) que los neonatos homocigotos para el alelo S, observándose una asociación del polimorfismo S19W del gen APOA5 con el crecimiento fetal, así como con la glucemia y el metabolismo lipoproteico. El hecho de que los neonatos portadores del alelo W presenten menor IMC e IP, sugiere que estos niños, aun siendo normopeso, a término y AGA son más pequeños, y recibieron una nutrición menos adecuada durante su vida fetal que los homocigotos para el alelo S, y presentan cierto grado de crecimiento asimétrico. Los valores bajos de IP se consideran marcadores de malnutrición y asimetría (Brandt, 1986), y sugieren un acúmulo de grasa limitado (Miller y Hassanein, 1971).

Este menor crecimiento de los portadores del alelo W parece relacionarse con una menor insulinemia, aunque sus niveles de HOMA-IR, también más bajos, apuntan a un uso eficiente de la insulina. Según Jansson y Powell (2007), los niños que sufren RCIU tienen menor insulinemia, aunque la insulina materna no esté afectada. Una explicación que relacione los

bajos niveles de insulina con el menor crecimiento fetal puede ser el efecto que esta hormona tiene sobre el sistema A de transporte de aminoácidos, el transporte de glucosa y la actividad LPL en el sincitiotrofoblasto (Jansson y Powell, 2007). Los valores bajos del cociente insulina/cortisol se suelen encontrar en niños malnutridos (Torún y Chew, 1994). Los neonatos portadores de W presentaban valores para este índice menores que los homocigotos para el alelo S. El estatus nutricional afecta mucho al sistema IGF (Álvarez Escolá y Escrivá Pons, 2008; Thissen y col., 1994), y cuando la expresión de IGF se altera por malnutrición perinatal, se afecta el desarrollo posnatal de las células  $\beta$ , dando lugar a un páncreas incapaz de responder adecuadamente a los cambios metabólicos en la vida adulta (Álvarez Escolá y Escrivá Pons, 2008). Se puede estimar que los neonatos homocigotos para el alelo S tienen un 40% más de partículas LDL, lo que explicaría su mayor peso, ya que estas partículas transportan colesterol a células proliferativas, jugando un papel importante en el crecimiento fetal (Madsen y col., 2004). Las LDL de los portadores de W estaban más oxidadas que las de los homocigotos de S. Nuestros datos señalan que la AE no fue capaz de reducir la oxidación de estas partículas en los portadores de W. Considerando el papel de las LDLox en la ECV, cabría esperar que los niños portadores de W tuvieran mayor RCV (Ross, 1999), y por tanto debería realizárseles un seguimiento de tales factores. Dallongeville y col., (2008) encontraron que los portadores de W son más propensos a padecer SM, aunque no hallaron relación alguna con marcadores lipídicos o lipoproteicos. De todas formas hay que recordar que esta mayor susceptibilidad a SM en la edad adulta se debe al aumento de los TG que se asocian con este polimorfismo, y no a su influencia sobre el resto de parámetros del perfil lipídico (Niculescu y col., 2007; Dallongeville y col., 2008). En este trabajo también analizamos la interacción del polimorfismo a estudio entre la madre y el neonato. La concurrencia del polimorfismo S19W en los neonatos y sus madres no afectó a las concentraciones de lípidos y lipoproteínas neonatales, pero sí se asoció con alteraciones en el crecimiento. El sistema IGF promueve el crecimiento y desarrollo de la unidad feto-placentaria en el embarazo (Laviola y col., 2005). Cuando ambos eran portadores de W, los neonatos tenían niveles de IGF-1 más bajos, lo que podría explicar el menor crecimiento y desarrollo de las células  $\beta$  de estos niños. Los TG y AGL circulantes de la madre aumentan durante el tercer trimestre del embarazo, proporcionando una fuente de AGL para la captación por la placenta, para su transferencia al feto y para la producción de leche (Herrera y col., 1988b; Magnusson-Olsson y col., 2006). Se podría sugerir que una madre portadora de W tendría menor actividad LPL, y así una menor disponibilidad de AGL para su feto que una madre homocigota para el alelo S. También presentaban mayor índice glucosa/insulina, que podría llevar a una menor actividad LPL.

En conclusión, estos hallazgos sugieren que los portadores del alelo W recibieron una nutrición menos adecuada durante el embarazo y que su estatus antioxidante de lipoproteínas era menor al de los neonatos homocigotos para el alelo S (Figura 6.13).



**Figura 6.13.** Posible mecanismo por el que los portadores de W del gen de la APOA5 modificarían la actividad lipoprotein lipasa (LPL) afectando a la disponibilidad de ácidos grasos libres (AGL), y por tanto a diferentes marcadores lipoproteicos. TG: triglicéridos; LE: lipasa endotelial; LP: lipoproteína; PL: fosfolípidos.

El “gen asociado a masa grasa y obesidad” (Fat mass and obesity associated gene, FTO) es uno de los genes cuyos polimorfismos mejor predicen la probabilidad de presentar incrementada la masa de tejido adiposo y, por tanto, de sufrir obesidad (Bouchard, 2011). La expresión de FTO es muy elevada en el hipotálamo, por lo que se ha sugerido que el gen FTO está implicado en el balance energético (Tung y col., 2010). De hecho, los alelos predictores de riesgo se han asociado con peores hábitos (Frayling y col., 2007; Dina y col., 2007; Scuteri y col., 2007), e ingestas más elevadas de alimentos, energía y grasa, y preferencia específica por alimentos más energéticos y grasos (Cecil y col., 2008; Speakman y col., 2008; Haupt y col., 2009; Tanofsky-Kraff y col., 2009; Wardle y col., 2009; Rodríguez-López y col., 2010; McCaffery y col., 2012). Entre los polimorfismos más predictivos se encuentra el rs9939609 FTO (T≥A), que se ha asociado en muchos estudios con el IMC, teniendo por término medio los adultos homocigotos del alelo A, 3 kg más de peso que los portadores del alelo T (Frayling y col., 2007). Igualmente Frayling y col. (2007) han observado un aumento del riesgo de padecer obesidad a la edad de 7 años.

Por otro lado, Ortega-Azorín y col. (2012) han señalado que la calidad de la dieta evaluada según la ADM, modula de forma significativa la asociación existente entre el polimorfismo FTO rs9939609 y la existencia de DM2.

Teniendo en cuenta que la influencia del polimorfismo materno y/o neonatal del gen FTO sobre marcadores de sensibilidad a la insulina y del perfil lipoproteico en el momento del nacimiento no se ha publicado hasta la fecha, se planteó el siguiente objetivo: **“Estudiar el efecto del polimorfismo rs9939609 del gen candidato FTO de las madres y de los neonatos sobre parámetros antropométricos, marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina al nacimiento”.**

Se estudiaron 53 neonatos caucásicos, a término y AGA. Coincidiendo con los resultados de Corella y col. (2012), dos tercios de las madres y sus hijos resultaron ser portadores del alelo A.

Entre los resultados más paradójicos se encuentra que los recién nacidos de madres portadoras del alelo obesogénico A, tuvieron menores niveles de insulina y HOMA-IR, pero más elevados de HOMA-IS y tHcys que los nacidos de madres homocigotas para el alelo T. Además las madres portadoras de A dieron a luz neonatos en los que fue más frecuente observar niveles reducidos de glucosa, CT, TG, insulina, y HOMA-IR. No obstante, los neonatos portadores del alelo A, como cabía esperar, tuvieron niveles mayores de insulina y HOMA-IR.

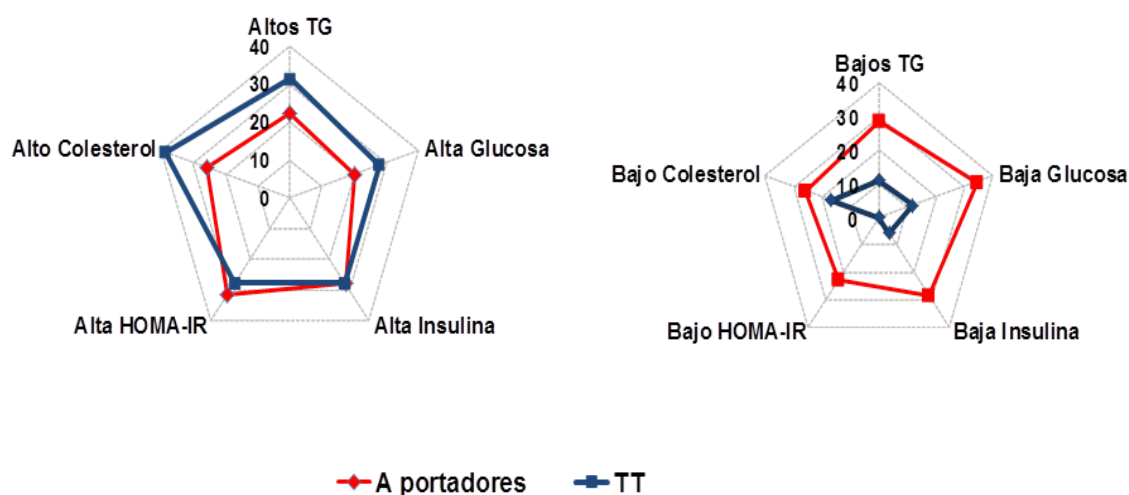
Es llamativo que los niveles de glucosa, insulina, HOMA-IR, y AE fueran más elevados en neonatos portadores del alelo A cuyas madres eran homocigotas para el alelo T, que en la asociación teóricamente más obesogénica: neonato portador de A\*madre portadora de A.

Entre los aspectos que pudieran explicar estos resultados, aparece la dieta seguida por estas mujeres, y que se relaciona con lo comentado por Ortega-Azorín y col. (2012) sobre la modulación de la calidad de la dieta en la asociación entre el polimorfismo FTO rs9939609 y la presencia de DM2. El análisis de la dieta materna y la asociación con el polimorfismo del FTO rs9939609 permitió cubrir el objetivo **“Comparar la calidad de la dieta de las gestantes y su posible efecto modulador sobre marcadores de RCV y de sensibilidad/resistencia a la insulina en neonatos, según la concurrencia del polimorfismo rs9939609 del gen candidato FTO madre/hijo”**.

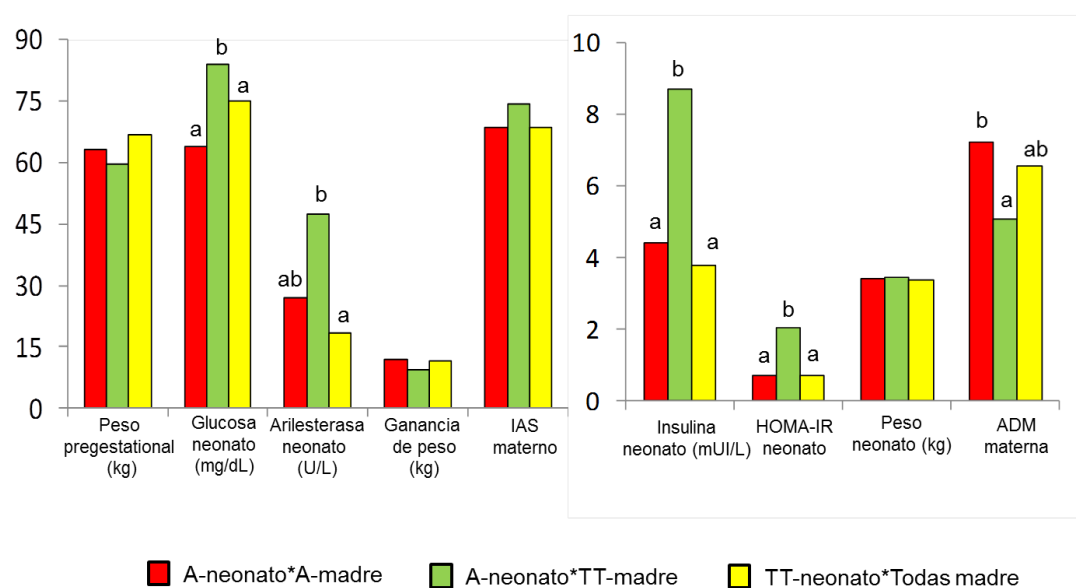
Tal como hemos comentado, este polimorfismo del FTO se ha asociado con el comportamiento alimentario y el tipo de alimento consumido (Dina y col., 2007; Frayling y col., 2007; Tung y col., 2010; Harbron y col., 2014). Así, las puntuaciones obtenidas para ADM tendieron a ser menores y las de IAS mayores en las madres homocigotas para el alelo T que en las portadoras del alelo A. Cabe pensar por tanto, que la capacidad obesogénica del alelo A sea potenciada o disminuida en función de la dieta consumida.

La potencialidad obesogénica del alelo A se confirma, teniendo en cuenta que el peso pregestacional fue un 6,9% más alto en las madres portadoras del alelo A que en las homocigotas para el alelo T. También podría pensarse que la ganancia de casi un 20% más de peso durante la gestación en las portadoras de A se debe también a la presencia de este alelo, aunque hay que señalar que en ningún caso se observaron ganancias excesivas de peso. Se ha comentado que una mayor ADM asegura gestaciones con ganancias de peso más adecuadas (Meltzer y col., 2011). Las madres portadoras del alelo A tuvieron puntuaciones ADM superiores ( $P = 0,006$ ) que las homocigotas para el alelo T, sugiriendo los beneficios del consumo de una dieta con perfil más mediterráneo.

También los resultados referentes a la asociación del gen FTO con los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina o de RCV al nacimiento parecen estar modulados por la calidad de la dieta, y lo que es más, por la interacción del polimorfismo materno con el polimorfismo del neonato. Así, la puntuación de ADM fue mayor en aquellas madres portadoras del alelo A cuyos hijos también eran portadores de A, mientras que la del IAS fue igual. Este hecho produjo que estos niños al nacimiento tuvieran niveles de glucosa e insulina menores que aquellos niños portadores del alelo A cuyas madres eran homocigotas para el alelo T, pero que sin embargo consumieron dietas de peor calidad según la puntuación ADM (Figura 6.14).



**Figura 6.14.** Prevalencia de neonatos portadores del alelo A u homocigotos para el alelo T del polimorfismo rs9939609 del gen FTO con niveles elevados (A) o reducidos (B) de diferentes marcadores relacionados con el síndrome metabólico.



**Figura 6.15.** Influencia de la interacción materno-neonatal del polimorfismo rs9939609 del gen FTO sobre la calidad de la dieta materna (índice de alimentación saludable (IAS) y adherencia a Dieta Mediterránea (ADM)), el peso pregestacional, la ganancia de peso en el embarazo, los valores al nacimiento de peso, glucosa ( $P=0,020$ ), insulina ( $P=0,042$ ), HOMA-IR ( $P=0,028$ ) y arilesterasa. HOMA-IR: *homeostasis model assessment insulin resistance*. Neonatos portadores del alelo A\*Madres portadoras del alelo A ( $N=27$ ); Neonatos portadores del alelo A\*Madres homocigotas para el alelo T ( $N=9$ ); Neonatos homocigotos para el alelo T\*cualquier genotipo materno ( $N=16$ ). El Índice de Alimentación saludable (IAS) ( $P>0,1$ ) y la Adherencia a Dieta Mediterránea (ADM) ( $P<0,001$ ) se determinaron en 16, 5, y 9 madres de los grupos citados, respectivamente. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

## **6. RESUMEN Y CONCLUSIONES**





## 6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El Estudio Mérida se ha realizado en un total de 225 neonatos, nacidos de gestaciones únicas en el Hospital de Mérida durante un año. Procedentes de encuestas personales de consultas durante el periodo obstétrico, del libro de partos del propio Hospital, y mediante analítica del suero y del ADN genómico, se obtuvieron datos referentes a:

1. Madres: edad, peso, ganancia de peso en el embarazo, primiparidad/multiparidad, tipo de parto y posibles complicaciones, edad gestacional, tolerancia a la glucosa durante la gestación por la prueba de O'Sullivan. Se realizaron encuestas nutricionales con el fin de conocer las características nutricionales de la calidad de la dieta seguida durante el embarazo, así como los posibles cambios en los hábitos alimentarios.

2. Neonatos: parámetros antropométricos (talla, peso, índice de masa corporal, índice ponderal), índice de Apgar al minuto y a los 5 minutos. En el momento del parto se obtuvo sangre de cordón mediante punción de la arteria umbilical a fin de evitar posibles contaminaciones por sangre, ADN, exudados, y líquidos tisulares maternos.

Se procedió a separar el suero para determinar la concentración de diferentes marcadores de RCV: CT, LDLc, HDLc, VLDLc, Lp(a), TG, Apo A1, Apo B, LDLox, homocisteína, arilesterasa, así como los cocientes CT/HDLc, LDLc/HDLc, cociente molar TG/HDLc, ApoA1/Apo B, Apo A1/HDLc, Apo B/LDLc, LDLox/LDLc y AE/HDLc. También en suero se determinaron diferentes hormonas y sustratos relacionados con el crecimiento y con la homeostasis de la glucosa: GH, IGF-1, cortisol, insulina, glucosa, HOMA-IR, HOMA-IS, HOMA-B, HOMA-D, QUICKI, y los cocientes glucosa/insulina e insulina/cortisol.

Los objetivos planteados pretendían establecer intervalos de normalidad en la población neonatal, determinar la influencia de la calidad de la dieta materna sobre los marcadores previamente citados, y estudiar la influencia de la interacción neonato-madre de dos genes candidatos: FTO y APOA5.

La mayoría de los resultados obtenidos se han compilado en revistas indexadas en el *Journal Citation Report* y permiten concluir

### A. Sobre las Revisiones Bibliográficas:

1. La dieta materna afecta al crecimiento, desarrollo y maduración del embrión y feto.
2. Cuando existe malnutrición, según su duración, se produce una menor ganancia de peso, que ejerce importantes efectos en el tamaño y actividad del páncreas.
3. Las adaptaciones metabólicas a las ingestas reducidas durante la gestación aumentan la sensibilidad a la insulina del feto, haciéndolo más eficiente después del nacimiento en ambientes limitados. La programación permanente del incremento de la

sensibilidad a la insulina se convierte en un arma de doble filo cuando la alimentación postnatal es abundante en energía y nutrientes.

4. Una buena adherencia a la Dieta Mediterránea confiere un crecimiento más adecuado durante los primeros estadios de la gestación.
5. Dietas con una adecuada adherencia a la Dieta Mediterránea presentan un aporte más correcto de energía, hidratos de carbono, grasa total, fibra y cociente ácidos grasos saturados/hidratos de carbono que aquellas con baja adherencia.

#### **B. Sobre los intervalos de normalidad y concurrencia de factores de riesgo cardiovascular y de resistencia a la insulina al nacimiento**

1. Nuestro estudio ha permitido establecer intervalos de normalidad en sangre de cordón para marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina (glucosa, insulina, GH, IGF-1, cortisol, HOMA-IR, HOMA-IS, QUICKI, cocientes glucosa/insulina e insulina/cortisol).
2. También se han establecido intervalos de normalidad para lipoproteínas (LDLc, HDLc, VLDLc, Lp(a), LDLox), arilesterasa, y homocisteína en una muestra de neonatos normales seleccionados.
3. La insulinemia neonatal influye más en los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina que la alteración de la tolerancia a la glucosa materna, lo que sugiere que al nacimiento existen otros factores que afectan a la insulinemia.
4. Se trata del primer estudio en el que se relacionan las concentraciones de homocisteína, lipoproteínas y apolipoproteínas con los marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina en una muestra relativamente amplia de neonatos seleccionados por criterios de normalidad.
5. La concurrencia de disglucemia y dislipemia (HDLc disminuido ó triglicéridos elevados) determina incrementos en la resistencia a la insulina y modifica negativamente el perfil lipoproteico al nacimiento.

#### **C. Sobre las características de la dieta durante el embarazo y su influencia en el neonato**

1. La dieta seguida por las gestantes presenta muchas de las limitaciones observadas en mujeres españolas de edades similares y no gestantes: bajo aporte de hidratos de carbono y fibra dietética, y elevado de colesterol, grasa y ácidos grasos saturados.
2. Algo más de la mitad de las madres consumieron dietas inadecuadas atendiendo al índice de alimentación saludable, mientras que un tercio de ellas tuvieron baja

adherencia a Dieta Mediterránea.

3. La calidad de la dieta permanece muy estable a lo largo de la gestación. Ninguna gestante cambió su dieta lo suficiente como para pasar de la categoría de dieta adecuada a inadecuada o viceversa según la adherencia a Dieta Mediterránea.
4. Las mujeres con dietas de mejor calidad tuvieron, dentro de la normalidad, una mayor glucemia y una menor colesterolemia. Las gestantes con mejor puntuación de adherencia a Dieta Mediterránea ganaron peso de forma más adecuada durante el embarazo.
5. Tanto la glucemia, la insulinemia, como los valores del HOMA-IR de los recién nacidos estuvieron inversamente correlacionados con la calidad de la dieta medida mediante el índice de alimentación saludable y la adherencia a Dieta Mediterránea.
6. La adecuada adherencia a la Dieta Mediterránea, desde el primer trimestre de la gestación, afecta al perfil lipoproteico y a los niveles de homocisteína al nacimiento.
7. El índice de alimentación saludable predice mejor que la adherencia a la Dieta Mediterránea la influencia de la dieta durante la gestación sobre el riesgo relativo de presentar hiperinsulinemia o hiperglucemia al nacimiento.
8. Al contrario, la adherencia a Dieta Mediterránea durante la gestación define mejor la influencia de la dieta sobre los marcadores de riesgo cardiovascular al nacimiento que el índice de alimentación saludable. Los neonatos cuyas madres seguían dietas de mayor calidad, en función de la adherencia a la Dieta Mediterránea, presentan riesgos relativos menores al nacimiento para niveles elevados de Apo B, LDLc y homocisteína, así como para valores bajos del cociente Apo A1/Apo B.

#### **D. Sobre la influencia de los polimorfismos en genes candidatos**

1. El polimorfismo S19W del gen APOA5 ejerce efectos significativos sobre el crecimiento y maduración del feto. Los neonatos portadores del alelo W son más pequeños, con tendencia al crecimiento asimétrico, lo que sugiere que recibieron una nutrición menos óptima durante el embarazo que los homocigotos para el alelo S.
2. Los neonatos portadores del alelo W presentaron menor insulinemia, HOMA-IR y cociente insulina/cortisol. A su vez, tuvieron menor número de partículas LDL, aunque más oxidadas, sugiriendo que su estatus antioxidante de lipoproteínas era peor que el de los neonatos homocigotos para el alelo S.
3. Independientemente del polimorfismo de la madre, los recién nacidos portadores del alelo W presentan menor índice de masa corporal, índice ponderal e insulina, pero la

conurrencia del alelo W en la madre y el neonato resulta en menores niveles de IGF-1 en el recién nacido.

4. En los neonatos portadores del alelo A para el polimorfismo rs9939609 del gen FTO, se observa un potencial efecto negativo sobre la homeostasis de la glucosa.
5. El polimorfismo materno del gen FTO rs9939609, afecta a la sensibilidad a la insulina y a los marcadores de enfermedad cardiovascular al nacimiento de forma contraria a como lo hace el polimorfismo del neonato.
6. La concurrencia de alelo A en neonato y madre mejoró muchos marcadores de sensibilidad a la insulina respecto a neonatos portadores del alelo A cuyas madres fueron homocigotas para el alelo T. Estos resultados se relacionan con el hecho de que las madres portadoras del alelo A tuvieron mayor adherencia a Dieta Mediterránea que las homocigotas para el alelo T.

#### **Conclusión general e indicaciones:**

La estricta selección de los neonatos realizada para la obtención de intervalos de normalidad en marcadores de sensibilidad/resistencia a la insulina y de riesgo cardiovascular, permitirán su utilización como valores de referencia en estudios posteriores. Los beneficios de un cribado al nacimiento de glucosa, triglicéridos y HDLc parecen evidentes para descubrir futuros candidatos a desarrollar diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, y permitir su temprana prevención y tratamiento.

Es necesario establecer estrategias de educación nutricional de la población entorno al embarazo. Esto crearía hábitos alimentarios correctos y estables, logrando el consumo de dietas de buena calidad y con alta adherencia a la Dieta Mediterránea durante todo el embarazo. Esto no sólo redundaría en la salud de la madre, sino que proporcionaría beneficios metabólicos a largo plazo en el neonato. También parece fundamental el seguimiento posterior de los recién nacidos del Estudio Mérida, durante la infancia y adolescencia, a fin de consolidar los hallazgos de esta memoria de Tesis Doctoral.

Por último, dadas las interacciones genética-dieta observadas sobre los marcadores de riesgo cardiovascular y de sensibilidad/resistencia a la insulina, sería interesante ampliar el estudio identificando otros genes candidatos en la cohorte de Mérida; así como desarrollar estudios similares al que hemos presentado en muestras poblacionales representativas de otros ámbitos geográficos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

AASVEE K, KURVINEN E, JORDANIA R, JAUHAINEN M, SUNDVALL J. 2004. Lipoprotein parameters in relation to other risk factors of atherosclerosis in adults and newborns: Tallinn Young Family Study. *Scand J Clin Lab Invest*. 64: 245-253.

ABETE I, GOYENECHEA E, ZULET MA, MARTÍNEZ JA. 2011. Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21 Suppl 2: B1-B15.

ABOUGHALIA AH, KHATER LM, ABD EL-WAHED MA, EL-BADRAWY MF. 2003. Lipoprotein (a) and lipid profile in neonates from mothers with three different types of diabetes mellitus. *Clin Biochem* 36: 563-569.

ACEVEDO CG, MÁRQUEZ JL, ROJAS S, BRAVO I. 2005 Insulin and nitric oxide stimulates glucose transport in human placenta. *Life Sci* 76:2643-2653.

AERTS L, HOLEMANS K, VAN ASSCHE FA. 1990. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes Metab Rev* 6: 147-167.

AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. 2011. Encuesta Española de Ingesta Dietética. Web visitada en diciembre 2014. [http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas\\_prensa/Presentacion\\_ENIDE.pdf](http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/Presentacion_ENIDE.pdf)

AFMAN L, MULLER M. 2006. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc* 106:569-576.

AKERBLOM HK, VIKARI J, RASANEN L, KUUSELA V, UHARI M, LAUTALA P. 1989. Cardiovascular risk in young Finns, results from the second follow-up study. *Ann Med* 21: 223-225.

ALBERTI-FIDANZA A, PARIZKOVA J, FRUTTINI D. 1995. Relationship between mothers' and newborns' nutritional and blood lipid variables. *Eur J Clin Nutr* 49: 289-298.

ALBERTI KG, ZIMMET PZ. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553.

ALBERTI K, ZIMMET PZ, SHAW JE, IDF EPIDEMIOLOGY TASK FORCE CONSENSUS GROUP. 2005. The metabolic syndrome—a new world-wide definition from the International Diabetes Federation Consensus. *Lancet* 366: 1059-1062.

ALBORN WE, PRINCE MJ, KONRAD RJ. 2007. Relationship of apolipoprotein C3 levels to serum triglycerides in patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 378: 154-158.

ALEXANDER CM, LANDSMAN PB, TEUTSCH SM, HAFFNER SM; THIRD NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY (NHANES III); NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). 2003. NCEP-

defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 52: 1210-1214.

ALLAIN CC, POON LS, CHAN CS, RICHMOND W, FU PC. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475.

ALONSO-APERTE E, VARELA MOSQUERA G. 2010. Ácido fólico y Vitamina B12. En: Tratado de nutrición. Gil A (ed). Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Sánchez de Medina F (coord). Editorial Médica Panamericana, S.A. Madrid. pp. 525-546.

ALONSO DE LA TORRE SR, SERRANO MA, MEDINA JM. 1992. Carrier-mediated beta D-hydroxybutirate transport in brush –border membrane vesicles from rat placenta. *Pediatr Res* 32:317-323.

ÁLVAREZ ESCOLÁ C, ESCRIVÁ PONS F. 2008. Influencia de la subnutrición perinatal sobre el desarrollo de las células beta y la acción de la insulina: realción con la diabetes 2 adulta. En: Desarrollo perinatal: Origen de las patologías adultas. Pascual-Leone AM, Medina JM. (eds). Instituto de España. RANF. Monografía XXIII. Madrid. pp. 239-265.

AMEMIYA S, DOBASHI K, URAKAMI T, SUGIHARA S, OHZEKI T, TAJIMA N. 2007. Metabolic syndrome in youths. *Pediatr Diabetes* 8 Suppl 9: 48-54.

AMIANO P, DORRONSORO M, DE RENOBLES M, RUIZ DE GORDOA JC, IRIGOIEN I; EPIC group of Spain. 2001. Very long chain omega-3 fatty acids as markers for habitual fish intake in a population consuming mainly lean fish: the EPIC cohort of Gipuzkoa. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur J Clin Nutr* 55: 827-832.

ANAD R, KANWAR U, SANYAL S. 2006. Characteristics of glucose transport across the microvillous membranes of human term placenta. *Nutr Hosp* 21:38-46.

ANDERSEN GE, FRIIS-HANSEN B. 1977. Cord serum lipid and lipoprotein-cholesterol values in normal and betamethasone-treated newborns of varying gestational age. *Acta Paediatr Scand* 66: 355-360.

ANDERSEN GE, FRIIS-HANSEN B. 1976a. Neonatal diagnosis of familial type II hyperlipoproteinemia. *Pediatrics* 57: 214-220.

ANDERSEN GE, FRIIS-HANSEN B. 1976b. Neonatal hypertriglyceridemia: a new index of antepartum-intrapartum fetal stress? *Acta Paediatr Scand* 65: 369-374.

ANDERSEN GE, JOHANSEN KB. 1980. LDL receptor studies in term and pre-term infants: Measurement of sterol synthesis in cord blood lymphocytes. *Acta Paediatr Scand* 69: 577-580.

ANDERSON PJ, CRITCHLEY JA, CHAN JC, COCKRAM CS, LEE ZS, THOMAS GN, TOMLINSON B. 2001. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1782-1788.



- ANDERSON DW, NICHOLS AV, PAN SS, LINDGREN FT. 1978. High density lipoprotein distribution. Resolution and determination of three major components in a normal population sample. *Atherosclerosis* 29:161-179.
- ANDREASEN CH, STENDER-PETERSEN KL, MOGENSEN MS, TOREKOV SS et al. 2008. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 57: 95-101.
- APGAR V. 1953. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anaesth Analg* 32: 260-267.
- ARELLANO CAMPOS O. 2012. Percepción del sabor, dieta mediterránea y nutrigenética: efecto sobre los componentes del síndrome metabólico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia.
- ARGILES J, HERRERA E. 1981. Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat. *Biol Neonate* 39: 37-44.
- ARRIZA JL, FAIMAN WA, WADICHE JI, MURDOCH GH, KAVANAUGH MP, AMARA SG. 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14:5559-5569.
- ASCASO JF. 2005. La cintura hipertrigliceridémica. *Clin Invest Arterioscl* 17: 286-296.
- ASSMANN G, SCHULTE H. 1992. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol* 70: 733-737.
- AUSTIN MA, TALMUD PJ, LUONG LA, HADDAD L, DAY IN, NEWMAN B, EDWARDS KL, KRAUSS RM, HUMPHRIES SE. 1998. Candidate-gene studies of the atherogenic lipoprotein phenotype: a sib-pair linkage analysis of DZ women twins. *Am J Hum Genet* 62:406-419.
- AVERNA MR, BARBAGALLO CM, DI PAOLA G, LABISI M, PINNA G, MARINO G, DIMITA U, NOTARBARTOLO A. 1991. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins AI, AII, B, CII, CIII and E in newborns. *Biol Neonate* 60: 187-192.
- AVIRAM M, ROSEMBLAT M. 2004. Paraoxonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 37: 1304-1316.
- AVIRAM M, ROSEMBLAT M, BILLECKE S, EROGUL J, SORENSON R, BISGAIER CL, NEWTON RS, LA DU B. 1999. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 26: 892-904.
- AVIRAM M, ROSEMBLAT M, BISGAIER CL, NEWTON RS, PRIMO-PARMO SL, LA DU BN. 1998a. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101: 1581-1590.

- AVIRAM M, BILLECKE S, SORENSON R, BISGAIER C, NEWTON R, ROSEMBLAT M, EROGUL J, HSU C, DUNLOP C, LA DU B. 1998b. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than the required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1617-1624.
- AYUK PT, SIBLEY C, DONNAI P, D'SOUZA S, GLAZIER JD. 2000. Development and polarization of cationic amino acid transporters and regulators in the human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C1162-C1171.
- BABIO N, BULLÓ M, BASORA J, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, FERNÁNDEZ-BALLART J, MÁRQUEZ-SANDOVAL F, MOLINA C, SALAS-SALVADÓ J; Nureta-PREDIMED Investigators. 2009. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:563-570.
- BACH-FAIG A, SERRA-MAJEM L. 2013. Dieta Mediterránea en el siglo XXI: posibilidades y oportunidades. En: Libro blanco de la nutrición en España. Fundación Española de la Nutrición. Varela Moreiras (coordinador general). Fundación Española de la Nutrición. Madrid. pp. 221-229
- BACH-FAIG A, BERRY EM, LAIRON D, REGUANT J, TRICHOPOULOU A, DERNINI S, MEDINA FX, BATTINO M, BELAHSEN R, MIRANDA G, SERRA-MAJEM L, on behalf of the Mediterranean Diet Foundation Expert Group. Collaborators (67). 2011. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr* 14: 2274-2284.
- BADIEE Z, KELISHADI R. 2008. Cord blood lipid profile in a population of Iranian term newborns. *Pediatr Cardiol* 29: 574–579.
- BALKAU B, CHARLES MA. 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 16: 442–443.
- BALKAU B, CHARLES MA, DRIVSHOLM T, BORCH-JOHNSEN K, WAREHAM N, YUDKIN JS, MORRIS R, ZAVARONI I, VAN DAM R, FESKINS E, GABRIEL R, DIET M, NILSSON P, HEDBLAD B; European Group For The Study Of Insulin Resistance (EGIR). 2002. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab* 28: 364-376.
- BANSAL N, CRUICKSHANK JK, McELDUFF P, DURRINGTON PN. 2005. Cord blood lipoproteins and prenatal influences. *Curr Opin Lipidol* 16: 400-408.
- BARKER DJ. 1999. Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child* 80: 305-307.
- BARKER DJ. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311: 171-174.
- BARKER DJP. 1994. Mothers, babies and disease. BMJ Publishing Group. Londres. Reino Unido.

- BARKER DJP, BERGMANN RL, OGRA PL. (eds). 2008. The window of opportunity: pre-pregnancy to 24 months of age. Nestlé Nutrition Institute. Karger. Basilea. pp. 1-266.
- BARKER DJ, BAGBY SP, HANSON HA. 2006. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:700-707.
- BARKER DJP, GLUCKMAN PD, GODFREY KM, HARDING JE, OWENS JA, ROBINSON JS. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341:938-941.
- BASSET JM. 1986. Nutrition of the conceptus: Aspects of its regulation. Symposium on "Nutrition and Early Development". *Proc Nutr Soc* 45: 1-10.
- BASTIDA S. 1992. Estudio "Toledo": Valores de referencia y factores de riesgo lipoproteico en neonatos. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, CUENA R, ARAGONÉS A, BRAVO C. 2007. Lipid and lipoprotein concentrations at age 4. Association with neonatal and parental levels. *Med Clin (Barc)* 128: 521-528.
- BASTIDA S, PEREA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 1998. Do neonates with high serum cholesterol levels have a different high density lipoprotein composition? *Eur J Pediatr* 157: 66-70.
- BASTIDA S, SÁNCHEZ MUNIZ FJ, CUESTA C, PEREA S, ARAGONÉS A. 1997. Male and female cord blood lipoprotein profile differences throughout the term-period. *J Perinat Med* 25: 184-191.
- BASTIDA S, SÁNCHEZ MUNIZ FJ, CUESTA C, PEREA S, URETA A. 1996a. Serum apolipoproteins A-I and B in male and female full-term newborns of the Toledo Study (Spain). *Acta Paediatr* 85: 750-752.
- BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, CUESTA C, PEREA S, URETA A. 1996b. Serum apolipoproteins A-I and B in male and female full-term newborns of the Toledo study (Spain). *Acta Paediatr* 85: 750-752.
- BASTIDA S, PEREA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, URETA A. 1993. Estudio Toledo: riesgo cardiovascular en neonatos y en la población infantil. *Acta Pediatr Esp* 51:643-648.
- BATTAGLIA FC, MESCHIA G. 1978. Principal substrates of fetal metabolism. *Physiol Rev* 58: 499-527.
- BEARDSALL K, DUNGER D. 2007. The physiology and clinical management of glucose metabolism in the newborn. *Endoc Dev* 12: 124-137.
- BEATON GH, BEARE J, RYU MY, MCHENRY EW. 1954. Protein metabolism in the pregnant rat. *J Nutr* 54: 291-304.
- BELKNAP WM, DIETSCHY JM. 1988. Sterol synthesis and low density lipoprotein clearance in vivo in the pregnant rat, placenta and fetus. Sources for tissue cholesterol during fetal development. *J Clin Invest* 82: 2077-2085.

- BERNEIS KK, KRAUSS RM. 2002. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 43: 1363-1379.
- BILLECKE S, DRAGANOV D, COUNSELL R, STETSON P, WATSON C, HSU C, LA DU BN. 2000. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 28: 1335-1342.
- BLADES BL, DUDMAN NP, WILCKEN DE. 1987. Variables affecting apolipoprotein B measurements in 3- to 5-day-old babies: a study of 4491 neonates. *Pediatr Res* 21: 608-614.
- BLANCO-COLIO LM, VALDERRAMA M, ALVAREZ-SALA LA, BUSTOS C, ORTEGO M, HERNÁNDEZ-PRESA MA, CANCELAS P, GÓMEZ-GERIQUE J, MILLÁN J, EGIDO J. 2000. Red wine intake prevents nuclear factor-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers during postprandial lipemia. *Circulation* 102: 1020-1026.
- BLATTER MC, JAMES RW, MESSMER S, BARJA F, POMETTA D. 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 211: 871-879.
- BLEICHER M, HÖGEL J, WUDY S, WABITSCH M, HOMOKI J, SORGO W, HEINZE E. 2002. Insulin resistance (HOMA) in relation to plasma cortisol, IGF-I, and IGFBP-3. A study in normal short-statured and GH-deficient children. *Horm Res* 58: 229-232.
- BOIZEL R, BENHAMOU PY, LARDY B, LAPORTE F, FOULON T, HALIMI S. 2000. Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care* 23: 1679-1685.
- BONDIA-PONS I, MAYNERIS-PERXACHS J, SERRA-MAJEM L, CASTELLOTE AI, MARINE A, LÓPEZ-SABATER MC. 2010. Diet quality of a population sample from coastal north-east Spain evaluated by a Mediterranean adaptation of the diet quality index (DQI). *Public Health Nutr* 13:12-24.
- BONET B, BRUNZELL JD, GOWN AM, KNOPP RH. 1992 Metabolism of very-low-density-lipoprotein triglyceride by human placental cells: the role of lipoprotein lipase. *Metabolism* 41:596-603.
- BÖRJESSON M, DAHLÖF B. 2005. Physical activity has a key role in hypertension therapy. *Läkartidningen* 102: 123-129.
- BOUCHARD C. 2011. Genetics of obesity: Are genetic differences contributing to the obesity epidemic? En: Obesity. Serrano Ríos M, Ordovás JM, Gutiérrez-Fuentes JA (eds). Elsevier. Barcelona. pp. 47-64.
- BOWIE MD. 1964. Intravenous glucose tolerance in kwashiorkor and marasmus. *S Afr Med J* 38: 328-329.

- BRANDT I. 1986. Growth dynamics of low-birth-weight infants with emphasis on the perinatal period. En: Human growth. Falkner F, Tanner JM (eds). 2ª ed. Plenum Press. Nueva York. Vol 1. pp. 415–475.
- BRAY GA, LOVEJOY JC, SMITH SR, DELANY JP, LEFEBVRE M, HWANG D, RYAN DH, YORK DA. 2002. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr* 132: 2488-2491.
- BROWN MS, GOLDSTEIN JL. 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am* 251: 58-66.
- BUCKLAND G, GONZÁLEZ CA, AGUDO A, VILADRELL M, BERENGUER A, AMIANO P, ARDANAZ E, ARRIOLA L, BARRICARTE A, BASTERRETXEA M, CHIRLAQUE MD, CIRERA L, DORRONSORO M, EGÜES N, HUERTA JM, LARRAÑAGA N, MARIN P, MARTÍNEZ C, MOLINA E, NAVARRO C, QUIRÓS JR, RODRÍGUEZ L, SÁNCHEZ MJ, TORMO MJ, MORENO-IRIBAS C. 2009. Adherence to the Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *Am J Epidemiol* 170:1518-1529.
- BUCKLAND G, BACH-FAIG A, SERRA-MAJEM L. 2008. Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies. *Obes Rev* 9: 582-593.
- BURTON GJ, JAUNIAUX E. 2004. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 11:342-352.
- BURTON GJ, JAUNIAUX E. 2001. Maternal vascularisation of the human placenta: does the embryo develop in a hypoxic environment? *Gynecol Obstet Fertil* 29: 503-508.
- BURTON GJ, WATSON AL, HEMPSTOCK J, SKEPPER JN, JAUNIAUX E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2954-2959.
- CABELLO-SAAVEDRA E, BES-RASTROLLO M, MARTÍNEZ JA, DIEZ-ESPINO J, BUIL-COSIALES P, SERRANO-MARTÍNEZ M, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA. 2010. Macronutrient intake and metabolic syndrome in subjects at high cardiovascular risk. *Ann Nutr Metab* 56: 152-159.
- CAI HJ, XIE CL, CHEN Q, CHEN XY, CHEN YH. 1991. The relationship between hepatic low-density lipoprotein receptor activity and serum cholesterol level in the human fetus. *Hepatology* 13: 852-857.
- CAMPOS H, BLIJLEVENS E, MCNAMARA JR, ORDOVAS JM, POSNER BM, WILSON PW, CASTELLI WP, SCHAEFER EJ. 1992. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb* 12: 1410-1419.
- CANALES A, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2003. Paraoxonase, something more than an enzyme? *Med Clin (Barc)* 121: 537-548.

- CANALES A, BENEDÍ J, NUS M, LIBRELOTTO J, SÁNCHEZ-MONTERO JM, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2007. Effects of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *J Am Coll Nutr* 26: 225-232.
- CARBAJAL AZCONA A, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2003. Guía de Prácticas. En: Nutrición y Dietética. García Arias MT y García Fernández MC. (eds). Secretariado de publicaciones y medios audiovisuales. Universidad de León. pp 1a-130a.
- CARIAPPA R, HEATH-MONNIG E, SMITH CH. 2003. Isoforms of aminoacid transporters in placental syncytiotrofoblast: plasma membrane localization and potential role in maternal/fetal transport. *Placenta* 24:713-726.
- CARLSON LA, HARDELL LI. 1978. Very low density lipoproteins in cord blood. *Clin Chim Acta* 90: 295-296.
- CARR BR, SIMPSON ER. 1984. Cholesterol synthesis by human fetal hepatocytes: Effects of hormones. *J Clin EndocrinolMetab* 58: 1111-1116.
- CARR BR,SIMPSON ER. 1981. Lipoprotein utilization and cholesterol synthesis by the human fetal adrenal gland. *Endocr Rev* 2: 306-326.
- CARR BR, PARKER RC, MILEWICH L, PORTER JC, MACDONALD PC, SIMPSON ER. 1980. The role of low density, high density and very low density lipoproteins in steroidogenesis by the human fetal adrenal gland. *Endocrinology*106: 1854-1860.
- CARRELLA M,COOPER AD. 1979. High affinity binding of chylomicron remnants to rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 338-342.
- CARVER TD, Hay WW. 1995. Uteroplacental carbon substrate metabolism and O<sub>2</sub> consumption after long term hypoglycaemia in pregnant sheep.*Am J Physiol* 269:E299-E308.
- CASANUEVA V, CID X, CHIANG MT, MOLINA M, FERRADA MC, PÉREZ R, CASANUEVA P. 1998. Serum lipids, lipoprotein and apolipoprotein levels in normal newborns. *Rev Med Chil* 126: 1073-1078.
- CASTELLI WP. 1984. Epidemiology of coronary heart disease. The Framingham Study.*Am J Med* 76: 4-12.
- CASTELLI WP, GARRISON RJ, WILSON PW, ABBOTT RD, KALOUSDIAN S, KANNEL WB .1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: The Framingham study. *JAMA* 256: 2835-2838.
- CATALANO PM, TYZBIR ED, WOLFE RR, CALLES J, ROMAN NM, AMINI SB, SIMS EA. 1993.Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes.*Am J Physiol*264(1 Pt 1):E60-67.
- CECIL JE, TAVENDALE R, WATT P, HETHERINGTON MM, PALMER CN. 2008. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med* 359: 2558–2566.

CERVERA RAL P, FARRÁN CODINA A, PADRÓ L, PALMA I, PUCHAL A. 2001. Leche y derivados. En: Guías alimentarias para la población española. Recomendaciones para una dieta saludable. Sociedad Española de la Nutrición Comunitaria. IM&C, S.A. Madrid. pp. 95-110.

CETIN I, MARCONI A, BOZETTI P. 1988. Umbilical amino acid concentrations in appropriate and small for gestational age infants: A biochemical difference present in utero. *Am J Obstet Gynecol* 158:120-126.

CHAJEK T, EISEMBERG S. 1978. Very low density lipoprotein. Metabolism of phospholipids, cholesterol and apolipoprotein C in the isolated perfused rat heart. *J Clin Invest* 61: 1654-1665.

CHARLTON V. 1993. Crecimiento fetal: aspectos nutricionales. En: Enfermedades del recién nacido: Schaffer-Avery. Taeush W, Ballard R (eds). 6ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 78-86.

CHARRIERE S, BERNARD S, AQALLAL M, MERLIN M, BILLON S, PERROT L, LE COQUIL E, SASSOLAS A, MOULIN P, MARCAIS C. 2008. Association of APOA5 -1131T>C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 394: 99-103.

CHAVES J, HERRERA E. 1980. "In vivo" glycerol metabolism in the pregnant rat. *Biol Neonate* 37: 172-179.

CHEN W, BAO W, BEGUM S, ELKASABANY A, SRINIVASAN SR, BERENSON GS. 2000. Age-related patterns of the clustering of cardiovascular risk variables of syndrome X from childhood to young adulthood in a population made up of black and white subjects: the Bogalusa Heart Study. *Diabetes* 49: 1042-1048.

CHEN HW, HEINIGER HJ, KANDUTSCH AA. 1975. Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1950-1954.

CHILLÓN P, ORTEGA FB, FERRANDO JA, CASAJUS JA. 2011. Physical fitness in rural and urban children and adolescents from Spain. *J Sci Med Sport* 14: 417-23.

CHRISTENSEN NC. 1981. Free fatty acids, glycerol and triglycerides during the first 24 hours in infants with a birth weight less than or equal to 2.700 grams. *Acta Paediatr Scand* 70: 485-490.

CHRISTOU H, CONNORS JM, ZIOTOPOULOU M, HATZIDAKIS V, PAPATHANASSOGLU E, RINGER SA, MANTZOROS CS. 2001. Cord blood leptin and insulin-like growth factor levels are independent predictors of fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 935-938.

CLEAL JK, LEWIS RM. 2008. The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human fetus. *J Neuroendocrinol* 20: 419-426.



- CLEAL JK, GLAZIER JD, NTANI G, CROZIER SR, DAY PE, HARVEY NC, ROBINSON SM, COOPER C, GODFREY KM, HANSON MA, LEWIS RM. 2011. Facilitated transporters mediate net efflux of amino acids to the fetus across the basal membrane of the placental syncytiotrophoblast. *J Physiol* 589: 987-997.
- COAN PM, FERGUSON-SMITH AC, BURTON GJ. 2004. Development dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod* 70:1806-1813.
- COCKERILL GW, McDONALD MC, MOTA-FILIPPE H, CUZZOCREA S, MILLER NE, THIEMERMANN C. 2001a. High density lipoproteins reduce organ injury and organ dysfunction in a rat model of hemorrhagic shock. *FASEB J* 15: 1941-1952.
- COCKERILL GW, HUEHNS TY, WEERASINGHE A, STOCKER C, LERCH PG, MILLER NE, HASKARD DO. 2001b. Elevation of plasma high-density lipoprotein reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* 103:108-112.
- COHICK WS, CLEMMONS DR. 1993. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55: 131-153.
- COLEMAN RA. 1989. The role of the placenta in lipid metabolism and transport. *Semin Perinatol* 13:180-191.
- COLEMAN SL, PARK YK, LEE JY. 2011. Unsaturated fatty acids repress the expression of adipocyte fatty acid binding protein via the modulation of histone deacetylation in RAW 264.7 macrophages. *Eur J Nutr* 50: 323-330.
- CONSTÂNCIA M, HEMBERGER M, HUGHES J, DEAN W, FERGUSON-SMITH A, FUNDELE R, STEWART F, KELSEY G, FOWDEN A, SIBLEY C, REIK W. 2002. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417:945-948.
- COOK S, WEITZMAN M, AUINGER P, NGUYEN M, DIETZ WH. 2003. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157: 821-827.
- CORELLA D, ORDOVÁS JM. 2007. Genes, dieta y enfermedades cardiovasculares. *Investigación y ciencia* 374: 76-83.
- CORELLA D, PORTOLES O. 2008. Avances en el conocimiento de las bases genéticas de la obesidad. En: Genética, Nutrición y enfermedad. Vaquero P (coordinadora general). Instituto Tomás Pascual Sanz y CSIC. EDIMSA. Madrid. pp. 53-66.
- CORELLA D, CARRASCO P, SORLÍ JV, COLTELL O, ORTEGA-AZORÍN C, GUILLÉN M, GONZÁLEZ JI, SÁIZ C, ESTRUCH R, ORDOVÁS JM. 2012. Education modulates the association of the FTO rs9939609 polymorphism with body mass index and obesity risk in the Mediterranean population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22: 651-658.



- CORELLA D, LAI CQ, DEMISSIE S, CUPPLES LA, MANNING AK, TUCKER KL, ORDOVAS JM. 2007. APOA5 gene variation modulates the effect of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. *J Mol Med* 85:119-128.
- CORELLA D, TUCKER K, LAHOZ C, COLTELL O, CUPPLES LA, WILSON PW, SCHAEFER EJ, ORDOVAS JM. 2001. Alcohol drinking determines the effect of the APOE locus on LDL-cholesterol concentrations in men: the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr* 73: 736-745.
- COUTO FD, MOREIRA LM, DOS SANTOS DB, REIS MG, GONÇALVES MS. 2007. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. *Eur J Clin Nutr* 61: 382-386.
- CRESS HR, SHAHER RM, LAFFIN R, KARPOWICZ K. 1977. Cord blood hyperlipoproteinemia and perinatal stress. *Pediatr Res* 11: 19-23.
- CRUZ ML, BERGMAN RN, GORAN MI. 2002. Unique effect of visceral fat on insulin sensitivity in obese Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1631-1636.
- CUESTA C, RÓDENAS S, MERINERO MC, RODRÍGUEZ-GIL S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 1998. Lipoprotein profiles and serum peroxide levels of aged women consuming palmolein or oleic acid-rich sunflower oil diets. *Eur J Clin Nutr* 52: 675-683.
- CUESTA C, SÁNCHEZ MUNIZ FJ, GARCÍA-LA CUESTA A, GARRIDO R, CASTRO A, SAN-FÉLIX B, DOMINGO A. 1989. Effects of age and cigarette smoking on serum concentration of lipids and apolipoproteins in a male military population. *Atherosclerosis* 80: 33-39.
- CUEVAS AM, GERMAIN AM. 2004. Diet and endothelial function. *Biol Res* 37: 225-230.
- CUEZVA JM. 1988. Glucolisis y gluconeogénesis en el feto y neonato. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera E. (ed). Ceura. Madrid. pp. 227-252.
- DA SILVA CF, ZANDONÁ MR, VITOLO MR, CAMPAGNOLO PD, ROTTA LN, ALMEIDA S, MATTEVI VS. 2013. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC Med Genet* 14: 34.
- DALLINGA-THIE GM, VAN TOL A, HATTORI H, VAN VARK-VAN DER ZEE LC, JANSEN H, SIJBRANDS EJG. 2006. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. *Diabetologia* 49: 1505-1511.
- DALLONGEVILLE J, COTTEL D, WAGNER A, DUCIMETIÈRE P, RUIDAVETS JB, ARVEILER D, BINGHAM A, FERRIÈRES J, AMOUEL P, MEIRHAEGHE A. 2008. The APOA5 Trp19 allele is associated with metabolic syndrome via its association with plasma triglycerides. *BMC Med Genet* 9:84.
- DAS UG, SADIQ HF, SOARES MJ, HAY WW JR, DEVASKAR SU. 1998. Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. *Am J Physiol* 274: R339-R347.

DAVID G, HAEGEL P. 1970. Embriología. En: Cuadernos prácticos. Vol I. Tuchman-Dupleis E. (ed). Toray Masson, S.A. Barcelona.

DAVIS PA, FORTE TM. 1982. Neonatal umbilical cord blood lipoproteins. Isolation and characterization of intermediate density and low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 2: 37-43.

DAVIS PA, FORTE TM, KANE JP, HARDMAN DA, KRAUSS RM, BLUM CB. 1983a. Apolipoprotein and size heterogeneity in human umbilical cord blood low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 753: 186-194.

DAVIS PA, FORTE TM, NICHOLS AV, BLUM CB. 1983b. Umbilical cord blood lipoproteins. Isolation and characterization of high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 3: 357-365.

DE FERRANTI SD, GAUVREAU K, LUDWIG DS, NEUFELD EJ, NEWBURGER JW, RIFAI N. 2004. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents. : findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 110: 2494-2497.

DE MELLO VD, ERKKILÄ AT, SCHWAB US, PULKKINEN L, KOLEHMAINEN M, ATALAY M, MUSSALO H, LANKINEN M, ORESIC M, LEHTO S, UUSITUPA M. 2009. The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *Eur J Nutr* 48: 447-455.

DE PAZ R, HERNÁNDEZ F. 2006. Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. *Nutr Hosp* 21:113-119.

DE SILVA HV, STUART WD, DUVIC CR, WETTERAU JR, RAY MJ, FERGUSON DG, ALBERS HW, SMITH WR, HARMONY JA. 1990. A 70-kDa apolipoprotein designated Apo J is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem* 265: 13240-13247.

DEL PRATO S, PULIZZI N, LUPI R, PENNO G, MICCOLI R. 2010. Type 2 diabetes: Insulin resistance vs.  $\beta$ -cell defect. En: Type 2 diabetes mellitus. Serrano Ríos M, Gutiérrez-Fuentes JA (eds). Elsevier. Barcelona. pp. 131-149.

DENNISON BA, KIKUCHI DA, SRINIVASAN SR, WEBBER LS, BERENSON GS. 1990. Measurement of apolipoprotein B as a screening test for identifying children with elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol. *J Pediatr* 117: 358-363.

DESFORGES M, LACEY HA, GLAZIER JD, GREENWOOD SL, MYNETT KJ, SPEAKE PF, SIBLEY CP. 2006. SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C305-C312.

DESPRÉS JP, LAMARCHE B, MAURIÈGE P, CANTIN B, DEGENAIS GR, MOORJANI S, LAPIEN PJ. 1996. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 334: 952-957.

- DEYOSE G, SCHWEDITSCH MO, PFEIFFER KP, ZECHNER R, KOSTNER GM. 1987. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. *J Clin Endocr Metab* 64: 704-712.
- DI CASTELNUOVO A, ROTONDO S, IACOVIELLO L, DONATI MB, DE GAETANO G. 2002. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 105: 2836-2844.
- DÍAZ M, LEAL C, RAMÓN Y CAJAL J, JIMÉNEZ MD, MARTÍNEZ H, POCOVÍ M, GRANDE F. 1989. Cord blood lipoprotein-cholesterol: relationship birth weight and gestational age of newborns. *Metabolism* 38: 435-438.
- DINA C, MEYRE D, GALLINA S, DURAND E, KÖRNER A, JACOBSON P, CARLSSON LM, KIESS W, VATIN V, LECOEUR C, DELPLANQUE J, VAILLANT E, PATTOU F, RUIZ J, WEILL J, LEVY-MARCHAL C, HORBER F, POTOCZNA N, HERCBERG S, LE STUNFF C, BOUGNÈRES P, KOVACS P, MARRE M, BALKAU B, CAUCHI S, CHÈVRE JC, FROGUEL P. 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39: 724-726.
- DOBIASOVA M, STOZICKY F, KOPECKA J. 1984. Lecithin-cholesterol acyltransferase activity in children in the early neonatal period. *Biol Neonate* 45: 165-168.
- DONEY ASF, DANNFALD J, KIMBER CH y col. 2009. The FTO gene is associated with an atherogenic lipid profile and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2:255-259.
- DRAGANOV DI, STETSON PL, WATSON CE, BILLECKE SS, LA DU BN. 2000. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoproteins against oxidation. *J Biol Chem* 275: 33435-33442.
- DUGGLEBY SL, JACKSON AA. 2001. Relationship of maternal protein turnover and lean body mass during pregnancy and birth length. *Clin Science* 101:65-72.
- DUMIN J. 1987. Energy requirements of pregnancy. *Lancet* 2:895-896.
- DUTTA-ROY AK. 2000. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* 71:315S-322S.
- DWYER JH, ALLAYEE H, DWYER KM, FAN J, WU H, MAR R, LUSIS AJ, MEHRABIAN M. 2004. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 350: 29-37.
- ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415-1428.
- ECONOMIDES DL, PROUDLES A, NICOLAIDES KH. 1989. Plasma insulin in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 160: 1091-1094.

EHISHAM S, BARRETT TG, SHAW NJ. 2000. Type 2 diabetes mellitus in UK children--an emerging problem. *Diabet Med* 17: 867-871.

ELCHALAL U, SCHAFF WT, SMITH SD, RIMON E, BILDIRICI I, NELSON DM, SADOVSKY Y. 2005. Insulin and fatty acids regulate the expression of the fat droplet-associated protein adipophilin in primary human trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 193:1716-1723.

EL-KHATTABI I, GRÉGOIRE F, REMACLE C, REUSENS B. 2003. Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGFBPs, and hepatocyte proliferation in the fetal rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E991-E1000.

ERICSSON A, HAMARK B, JANSSON N, JOHANSSON BR, POWELL TL, JANSSON T. 2005a. Hormonal regulation of glucose and system A amino acid transport in first trimester placental villous fragments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R656-R662.

ERICSSON A, HAMARK A, POWELL T, JANSSON T. 2005b. Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Human Reprod* 20: 521-530.

ERIKILÄ AT, SCHWAB US, DE MELLO VD, LAPPALAINEN T, MUSSALO H, LEHTO S, KEMI V, LAMBERG-ALLARDT C, UUSITUPA MI. 2008. Effects of fatty and lean fish intake on blood pressure in subjects with coronary heart disease using multiple medications. *Eur J Nutr* 47: 319-328.

ESPÁRRAGO M. 1997. Estudio "La Serena": Características antropométricas y lipoproteicas de neonatos extremeños. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

ESPÁRRAGO M, BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 1999. Estudio "La Serena": características antropométricas y riesgo cardiovascular futuro de neonatos y niños extremeños. *Acta Ped Esp* 57: 259-268.

ESPOSITO K, MARFELLA R, CIOTOLA M, DI PALO C, GIUGLIANO F, GIUGLIANO G, D'ARMIENTO M, D'ANDREA F, GIUGLIANO D. 2004. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292: 1440-1446.

ESPOSITO K, NAPPO F, GIUGLIANO F, GIUGLIANO G, MARFELLA R, GIUGLIANO D. 2003. Effect of dietary antioxidants on postprandial endothelial dysfunction induced by a high-fat meal in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 77: 139-143.

ESTRUCH R. 2000. Wine and cardiovascular disease. *Food Res Intern* 33: 219-226.

ESTRUCH R, ROS E, SALAS-SALVADÓ J, COVAS MI, CORELLA D, ARÓS F, GÓMEZ-GRACIA E, RUIZ-GUTIÉRREZ V, FIOL M, LAPETRA J, LAMUELA-RAVENTOS RM, SERRA-MAJEM L, PINTÓ X, BASORA J, MUÑOZ MA, SORLÍ JV, MARTÍNEZ JA, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA; PREDIMED Study Investigators. 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 368: 1279-1290.

- ESTRUCH R, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, CORELLA D, SALAS-SALVADÓ J, RUIZ-GUTIÉRREZ V, COVAS MI, FIOL M, GÓMEZ-GRACIA E, LÓPEZ-SABATER MC, VINYOLES E, ARÓS F, CONDE M, LAHOZ C, LAPETRA J, SÁEZ G, ROS E; PREDIMED Study Investigators. 2006. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145: 1-11.
- EWENS KG, JONES MR, ANKENER W, STEWART DR, URBANEK M y col. 2011. FTO and MC4R gene variants are associated with obesity in polycystic ovary syndrome. *PLoS One* 20:e16390
- FABIANI F, RODRÍGUEZ FRANCÉS I, DOMÍNGUEZ R, DELGADO F, VELA F, DURÁN L. 1984. Colesterol, triglicéridos y lipoproteínas en sangre de cordón. Relaciones materno-fetales. *Rev Esp Pediatr* 40: 199-204.
- FAGOT-CAMPAGNA A, PETTITT DJ, ENGELGAU MM, BURROWS NR, GEISS LS, VALDEZ R, BECKLES GL, SAADDINE J, GREGG EW, WILLIAMSON DF, NARAYAN KM. 2000. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 136: 664-672.
- FAIRMAN WA, VANDERBERG RJ, ARRIZA JL, KAVANAUGH MP, AMARA SG. 1995. An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- FALKNER B, HASSINK S, ROSS J, GIDDING S. 2002. Dysmetabolic syndrome: multiple risk factors for premature adult disease in an adolescent girl. *Pediatrics* 110(1 Pt 1): e14.
- FALKNER B, SHERIF K, SUMNER AE, KUSHNER H. 1999. Blood pressure increase with impaired glucose tolerance in young adult american blacks. *Hypertension* 34: 1086-1090.
- FALKNER F. 1985. Some introductory concepts of human growth: An overview. *Acta Paediatr Scand Suppl* 319: 17-20.
- FAO/OMS. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. 2010. The Joint FAO/WHO expert consultation on fats and fatty acids in human nutrition. FAO food and nutrition paper 91. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- FERNÁNDEZ E, VALCARCE C, CUEZVA JM, MEDINA JM. 1983. Postnatal hypoglycemia and gluconeogenesis in the newborn rat. Delayed onset of gluconeogenesis in prematurely delivered newborns. *Biochem J* 214: 525-532.
- FERRARA LA, RAIMONDI AS, D'EPISCOPO L, GUIDAS L, DELLO RUSSO A, MAROTTA T. 2000. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med* 160: 837-842.
- FERRO-LUZZI A, JAMES WP, KAFATOS A. 2002. The high-fat Greek diet: a recipe for all? *Eur J Clin Nutr* 56: 796-809.
- FIELDING BA, FRAYN KN. 1998. Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br J Nutr* 80:495-502.

- FIELDING CJ, HAVEL RJ. 1977. Lipoprotein lipase. *Arch Pathol Lab Med* 101: 225-229.
- FISCHER J, KOCH L, EMMERLING C, VIERKOTTEN J, PETERS T, BRÜNING JC, RÜTHER U. 2009. Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity. *Nature* 458: 894–988.
- FLIGHT I, CLIFTON P. 2006. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr* 60: 1145-1159.
- FLORIDO NAVÍO J, BELTRÁN MONTALBÁN E, CAMPOY FOLGOSO C. 2010. Nutrición durante la gestación y la lactancia. En: Tratado de Nutrición. Tomo III. Nutrición humana en el estado de salud. Gil A. (ed). Martínez de Victoria E, Maldonado J. (coords). 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 133-149.
- FØNNESØ V, DAHL LB, MOE PJ, INGEBRETSEN OC. 1991. Does VLDL-LDL-cholesterol in cord serum predict future level of lipoproteins? *Acta Paediatr Scand* 80: 780-785.
- FORBES K, WESTWOOD M. 2008. The IGF axis and placental function. A mini review. *Horm Res* 69:129-137.
- FOSBROOKE AS, WHARTON BA. 1973. Plasma lipids in umbilical cord blood from infants of normal and low birth weight. *Biol Neonate* 23: 330-338.
- FOWDEN AL, MUNDY L, SILVER M. 1998. Developmental regulation of glucogenesis in the sheep fetus during late gestation. *J Physiol* 508:937-947.
- FRANCÉS F, CORELLA D, SORLÍ JV, GUILLÉN M, GONZÁLEZ JI, PORTOLÉS O. 2005. Validating a rapid method for detecting common polymorphisms in the APOA5 gene by melting curve analysis using LightTyper. *Clin Chem* 51: 1279–1282.
- FRAYLING TM, TIMPSON NJ, WEEDON MN, ZEGGINI E, FREATHY RM, LINDGREN CM, PERRY JR, ELLIOTT KS, LANGO H, RAYNER NW, SHIELDS B, HARRIES LW, BARRETT JC, ELLARD S, GROVES CJ, KNIGHT B, PATCH AM, NESS AR, EBRAHIM S, LAWLOR DA, RING SM, BEN-SHLOMO Y, JARVELIN MR, SOVIO U, BENNETT AJ, MELZER D, FERRUCCI L, LOOS RJ, BARROSO I, WAREHAM NJ, KARPE F, OWEN KR, CARDON LR, WALKER M, HITMAN GA, PALMER CN, DONEY AS, MORRIS AD, SMITH GD, HATTERSLEY AT, MCCARTHY MI. 2007. A common variant in the FTO gene is associated with the body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316: 889-894.
- FREATHY RM, TIMPSON NJ, WEEDON MN y col. 2008. Common variation in the FTO genes alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 57:1419-1426.
- FREDRIKSSON R, HÄGGLUND M, OLSZEWSKI PK, STEPHANSSON O, JACOBSSON JA, OLSZEWSKA AM, LEVINE AS, LINDBLOM J, SCHIÖTH HB. 2008. The obesity gene, *FTO*, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149: 2062–2071.

- FREEDMAN DS, MEI Z, SRINIVASAN SR, BERENSON GS, DIETZ WH. 2007. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *J Pediatr* 150: 12-17. e2
- FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifugation. *Clin Chem* 18: 499-502.
- FRIEDMAN HI, CARDELL RR JR. 1972. Morphological evidence for the release of chylomicra from intestinal absorptive cells. *Exp Cell Res* 75: 57-62.
- FUHRMAN B, VOLKOVA N, AVIRAM M. 2002. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 161: 307-316.
- FUJITA N, BABA T, TOMIYAMA T, KODAMA T, KAKO N. 1992. Hyperinsulinaemia and blood pressure in patients with insulinoma. *BMJ* 304: 1157.
- FUJITA H, OKADA T, INAMI I, MAKIMOTO M, HOSONO S, MINATO M, TAKAHASHI S, MUGISHIMA H, YAMAMOTO T. 2008. Heterogeneity of high-density lipoprotein in cord blood and its postnatal change. *Clin Chim Acta* 389: 93-97.
- GANJI V, KAFAI MR. 2003. Third National Health and Nutrition Survey. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 77: 826-833.
- GARCÍA-LORDA P, MEGIAS RANGIL I, SALAS-SALVADÓ J. 2003. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr* 57 Suppl 1: S8-S11.
- GARCÍA-PEREGRÍN E. 1988. Evolución perinatal de las enzimas de la colesterogénesis. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera E. (ed.) Ceura. Madrid. pp. 301-317.
- GARROW JS. 1983. Indices of adiposity. *Nutr Abs Rev* 53: 697-708.
- GERKEN, T.; GIRARD, C.A.; TUNG, Y.C.; WEBBY, C.J.; SAUDEK, V.; HEWITSON, K.S.; YEO, G.S.; McDONOUGH, M.A.; CUNLIFFE, S.; MCNEILL, L.A.; *et al.* 2007. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318: 1469-1472.
- GESTEIRO E, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, ESPÁRRAGO RODILLA M, RODRÍGUEZ BERNAL B, BASTIDA S. 2015. Mediterranean Diet and pregnancy. En: The Mediterranean Diet. An Evidence-Based Approach. Preedy R, Watson RR (eds). Elsevier Inc. Amsterdam. pp. 491-503.



- GESTEIRO E, BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2013. Cord-blood lipoproteins, homocysteine, insulin sensitivity/resistance marker profile, and concurrence of dysglycaemia and dyslipaemia in full-term neonates of the Mérida Study. *Eur J Pediatr* 172: 883-894.
- GESTEIRO E, BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2009. Insulin resistance markers in term, normoweight neonates. The Mérida cohort. *Eur J Pediatr* 168: 281-288.
- GIL HERNÁNDEZ A, AGUILERA GARCÍA C, GÓMEZ LORENTE C. 2010. Nutrigenómica. En: Tratado de Nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Gil Hernández A (director), Sánchez de Medina (coordinador). Tomo 1. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 751-806.
- GIL SÁNCHEZ A, KOLETZKO B, LARQUÉ E. 2012. Current understanding of placental fatty acid transport. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15: 265-272.
- GIL SÁNCHEZ A, LARQUÉ E, DEMMELMAIR H, ACIEN MI, FABER FL, PARRILLA JJ, KOLETZKO B. 2010. Maternal-fetal in vivo transfer of [<sup>13</sup>C] docosahexaenoic and other fatty acids across the human placenta 12h after maternal oral intake. *Am J Clin Nutr* 92: 115-122.
- GIRARD J, FERRÉ P. 1982. Metabolic and hormonal changes around birth. En: Biochemical development of the fetus and neonate. Jone CT. (ed). Elsevier Biochemical Press. Amsterdam. pp. 551-571.
- GIVNER ML, JAFFE RB. 1971. Cholesterol biosynthesis in human fetal liver and adrenal. *Steroids* 18: 1-10.
- GLAZIER JD, JANSSON T. 2004. Placental transport in early pregnancy. A workshop report. *Placenta* 25 Suppl A: S57-S59.
- GLICK MR, REIDER KW, JACKSON SA. 1986. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentations. *Clin Chem* 32: 470-475.
- GLUECK CJ, STEINER P, LEUBA V. 1973. Cord blood low-density lipoprotein-cholesterol: estimation versus measurement with the preparative ultracentrifuge. *J Lab Med* 82: 467-472.
- GÓMEZ GERIQUE JA. 1988. Lipoproteínas. En: Lipoproteínas plasmáticas. Boehringer Mannheim S.A. Barcelona.
- GOODYEAR MD, KRLEZA-JERIC K, LEMMENS T. 2007. The Declaration of Helsinki. *BMJ* 335: 624-625.
- GORAN MI, BERGMAN RN, CRUZ ML, WATANABE R. 2002. Insulin resistance and associated compensatory responses in African-American and Hispanic children. *Diabetes Care* 25: 2184-2190.
- GORDON DJ, PROBSTFIELD JL, GARRISON RJ, NEATON JD, CASTELLI WP, KNOKE JD, JACOBS DR JR, BANGDIWALA S, TYROLER HA. 1989. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79: 8-15.



- GORDON T, CASTELLI WP, HJORTLAND MN, KANNEL WB, DAWBER TR. 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62: 707-714.
- GOWER BA, NAGY TR, GORAN MI. 1999. Visceral fat, insulin sensitivity, and lipids in prepubertal children. *Diabetes* 48: 1515-1521.
- GRAO-CRUCES A, NUÑAL A, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ A, PORCEL-GÁLVEZ AM, MORAL-GARCÍA JE, MARTÍNEZ-LÓPEZ EJ. 2013. Adherencia a la dieta mediterránea en adolescentes rurales y urbanos del sur de España, satisfacción con la vida, antropometría y actividades físicas y sedentarias. *Nutr Hosp* 28: 1129-1135.
- GREEN PHR, GLICKMAN RM, SAUDEK CD, BLUM CB, TALL AR. 1979. Human intestinal lipoproteins. Studies in chyluric subjects. *J Clin Invest* 64: 233-242.
- GRILLO MA, LANZA A, COLOMBATTO S. 2008. Transport of amino acids through the placenta and their role. *Amino Acids* 34: 517-523.
- GREENBERG JA, BELL SJ, GUAN Y, YU Y-H. 2011. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Rev Obstet Gynecol* 4: 52-59.
- GRUNDY SM, BREWER HB JR, CLEEMAN JI, SMITH SC JR, LENFANT C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. 2004 Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109: 433-438.
- GUDE NM, STEVENSON JL, ROGERS S, BEST JD, KALIONIS B, HUISMAN MA, ERWICH JJ, TIMMER A, KING RG. 2003. GLUT12 expression in human placenta in first trimester and term. *Placenta* 24: 566-570.
- Gupta A, Gupta V. 2010. Metabolic syndrome: What are the risks for humans? *Biosci Trends* 4: 204-212.
- HA YC, CALVERT GD, MCINTOSH GH, BARTER PJ. 1981. A physiologic role for the sterified cholesterol transfer protein in vivo studies in rabbits and pigs. *Metabolism*. 3: 380-383.
- HAFFNER SM, MYKKÄNEN L, FESTA A, BURKE JP, STERN MP. 2000. Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation* 101: 975-980.
- HAGGARTY P. 2004. Effect of placental function in fatty acid requirements during pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 58: 1559-1570.
- HAGGARTY P. 2002. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth- a review. *Placenta* 23 Suppl A: S28-S38.
- HAHN P. 1982. Development of lipid metabolism. *Ann Rev Nutr* 2: 91-111.

- HALES CN, BARKER DJF. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5-20.
- HALES CN, BARKER DJF. 1992. Type 2 (non insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35: 595-601.
- HALES CN, OZANNE SE. 2003. For debate: fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia* 46:1013-1019.
- HALLER S, SPIEGLER J, HEMMELMANN C, KÜSTER H, VOCHER M, MÖLLER J, MÜLLER D, KRIBBS A, HOEHN T, HÄRTEL C, HERTING E, GÖPEL W. 2013. Polymorphisms in FTO and MAF Genes and Birth Weight, BMI, Ponderal Index, Weight Gain in a Large Cohort of Infants with a Birth Weight below 1500 Grams. *PLoS ONE* 8: e66331.
- HAN Z, NIU T, CHANG J, LEI X, ZHAO M, WANG Q, CHENG W, WANG J, FENG Y, CHAI J. 2010. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* 464: 1205–1209.
- HARBON J, VAN DER MERWE L, ZAAHL MG, KOTZE MJ, SENEKAL M. 2014. Fat mass and obesity-associated (FTO) gene polymorphisms are associated with physical activity, food intake, eating behaviors, psychological health, and modeled change in body mass index in overweight/obese Caucasian adults. *Nutrients* 6: 3130-3152.
- HARDELL LI. 1981a. Serum lipids and lipoproteins at birth based on a study of 2815 newborn infants. I. Concentrations and distributions of triglycerides and cholesterol. *Acta Paediatr Scand Suppl* 285: 5-10.
- HARDELL LI. 1981b. Serum lipids and lipoproteins at birth based on a study of 2815 newborn infants. II. Relations between materno-fetal factors and the concentrations of triglycerides and cholesterol. *Acta Paediatr Scand Suppl* 285: 11-20.
- HAREL M, AHARONI A, GAIDUKOV L, BRUMSHTEIN B, KHERSONSKY O, MEGED R, DVIR H, RAVELLI RB, MCCARTHY A, TOKER L, SILMAN I, SUSSMAN JL, TAWFIK DS. 2004a. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11: 412-419.
- HAREL M, AHARONI A, GAIDUKOV L, BRUMSHTEIN B, KHERSONSKY O, MEGED R, DVIR H, RAVELLI RB, MCCARTHY A, TOKER L, SILMAN I, SUSSMAN JL, TAWFIK DS. 2004b. Corrigendum: Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1253.
- HAUGUEL S, DESMAIZIERES V, CHALLIER JC. 1986. Glucose uptake, utilization and transfer by the human placenta as a function of maternal glucose concentration. *Pediatr Res* 20:269-273.
- HAUGUEL-DE MOUZON S, CHALLIER JC, KACEMI A, CAÛZAC M, MALEK A, GIRARD J. 1997. The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2689-2694.

HAUPT A, THAMER C, STAIGER H, TSCHITTER O, KIRCHHOFF K, MACHICAO F, HÄRING HU, STEFAN N, FRITSCH A. 2009. Variation in the *FTO* gene influences food intake but not energy expenditure. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117: 194–197.

HAYMOND M, KARL I, PAGLIARA A. 1974. Increased gluconeogenic substrates in the small for gestational age infant. *N Engl J Med* 291:322-328.

HEASMAN L, CLARKE L, FIRTH K, STEPHENSON T, SYMONDS ME. 1998. Influence of restricted maternal nutrition in early to mid gestation on placental and fetal development at term in sheep. *Pediatr Res* 44:546-551.

HEDIGER ML, OVERPECK MD, MCGLYNN A, KUCZMARSKI RJ, MAURER KR, DAVIS WW. 2000. Growth and fatness at three to six years of age in children born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1401-1406.

HENSON MC, CASTRACANE VD. 2000. Leptin in pregnancy. *Biol Reprod* 63:1219-1228.

HERNÁNDEZ M. 1992. El patrón de crecimiento humano. Factores que regulan el crecimiento. *An Esp Pediatr* 36 Suppl 50: 9-18.

HERRERA E. 2002b. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 19: 43-55.

HERRERA E. 1988b. Aspectos básicos de las adaptaciones metabólicas en la madre durante la gestación y relaciones materno-fetales. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera E. (ed). Fundación Areces. Ceura. Madrid. pp. 17-39.

HERRERA E, LASUNCIÓN MA 1990. Nutrición fetal. Transporte placentario de metabolitos y adaptaciones metabólicas de la madre. En: XII Reunión Anual de Medicina Perinatal. II Workshop Neonatal. Metabolismo, nutrición y alimentación del prematuro y recién nacido de bajo peso. Valencia. ENE. Madrid. pp. 37-50.

HERRERA E, RAMOS MP. 2008. Papel del tejido adiposo, sensibilidad insulínica e ingesta lipídica en la gestación y su implicación en el riesgo de padecer diabetes en la edad adulta. En: Desarrollo perinatal: Origen de las patologías adultas. Pascual-Leone AM, Medina JM. (eds). Instituto de España. RANF. Monografía XXIII. Madrid. pp. 206-226.

HERRERA E, BONET B, LASUNCIÓN MA. 1998. Maternal-fetal transfer of lipids metabolites. En: Fetal and neonatal physiology. Polin RA, Fox WE (eds). Saunders WB. Co, Ltd. Filadelfia. Vol.1. pp. 447-458.

HERRERA E, GÓMEZ-CONRADO D, LASUNCIÓN MA. 1987. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol. Neonate* 51: 70-77.

- HERRERA E, KNOPP R, FREINKEL N. 1969. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *J Clin Invest* 48: 2260-2272.
- HERRERA E, TESTAR X, LLOVERA M. 1988b. Efectos metabólicos del etanol. Alcohol en gestación y sus consecuencias en las relaciones feto/madre. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera E. (ed). Fundación Areces. Ceura. Madrid. pp. 577-599.
- HERRERA E, AMUSQUIVAR E, LÓPEZ-SOLDADO I, ORTEGA H. 2006a. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 65 Suppl 3:59-64.
- HERRERA E, LASUNCIÓN MA, GÓMEZ-CORONADO D, ARANDA P, LÓPEZ-LUNA P, MAIER I. 1988a. Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 158:1575-1583.
- HOELTZLI SD, SMITH CH. 1989. Alanine transport systems in insolated basal membrane of human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 256:C630-C637.
- HOLMES R, MONTEMAGNO R, JONES J PREECE M, RODECK C, SOOTHILL P. 1997. Fetal and maternal plasma insulin-like growth factors and binding proteins in pregnancies with appropriate or retarded fetal growth. *Early Hum Dev* 49:7-17.
- HOLVOET P, DONCK J, LANDELOOS M, BROUWERS E, LUIJTENS K, ARNOUT J, LESAFFRE E, VANRENTERGHEM Y, COLLEN D. 1996. Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost* 76: 663-669.
- HOMMES FA. 1975. Energetic aspects of late fetal and neonatal development. En: Normal and pathological development of energy metabolism. Hommes FA y Van der Berg CJ. (eds). Academic Press. Londres. pp. 1-9.
- HOYO C, MURTHA AP, SCHILDKRAUT JM, FORMAN MR, CALINGAERT B, DEMARK-WAHNEFRIED W, KURTZBERG J, JIRTLE RL, MURPHY SK. 2011. Folic acid supplementations before and during pregnancy in the Newborn Epigenetics Study (NEST). *BMC Public Health* 11:46.
- HYTEN F, LEITCH I. 1971. The physiology of human pregnancy. 2<sup>a</sup> ed. Blackwell Scientific Publ. Oxford. pp. 286-369.
- ILLSLEY NP. 2000. Glucose transporters in human placenta. *Placenta*. 21:14-20.
- INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD. 2006a. Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements. National Academy Press. Washington DC.
- INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD. 2006b. Dietary reference intakes research synthesis workshop summary. National Academic Press. Washington DC.
- INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION BOARD. 1990. Nutrition during pregnancy. Partes I y II. National Academy Press. Washington DC.

- IRWIN DM, TAN H. 2014. Evolution of glucose utilization: glucokinase and glucokinase regulator protein. *Mol Phylogenet Evol* 70: 195-203.
- LUGHETTI L, BRUZZI P, PREDIERI B. 2010. Evaluation and management of hyperlipidemia in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr* 22: 485-493.
- JACKSON AA. 1987. Measurement of protein turnover during pregnancy. *Hum Nutr Clin Nutr* 41:497-498
- JAMES PT. 2011. Obesity: A modern pandemic. En: Obesity. Serrano Ríos M, Ordovás JM, Gutiérrez Fuentes JA. (eds) Elsevier. Barcelona. pp. 19-34.
- JANSSON N, ROSARIO FJ, GACCIOLI FLAHER S, JONES HN, ROOS S, JANSSON T, POWELL TL. 2013. Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 105-113.
- JANSSON T. 2001. Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatr Res* 49: 141-147.
- JANSSON T, POWELL TL. 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 113: 1-13.
- JANSSON T, CETIN I, POWELL TL, DESOYE G, RADAELLI T, ERICSSON A, SIBLEY CP. 2003 Placental transport and metabolism in fetal overgrowth- a workshop report. *Placenta* 27 (Suppl A): S109-S113.
- JANSSON T, SCHOLTBACH V, POWELL TL. 1998. Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 44: 532-537.
- JANSSON T, WENNERGREN M, ILLSLEY NP. 1993. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Endocrinol Metab* 77: 1554-1562.
- JAUNIAUX E, WATSON AL, HEMPSTOCK J, BAO YP, SKEPPER JN, BURTON GJ. 2000. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157:2111-2122.
- JELLYMAN JK, GARDNER DS, FOWDEN AL, GIUSSANI DA. 2004. Effects of dexametasone on the uterine and umbilical vascular beds during basal and hypoxemic conditions in sheep. *Am J Obstet Gynec* 190:825-835.
- JIA G, FU Y, ZHAO X, DAI Q, ZHENG G, YANG Y, YI C, LINDAHL T, PAN T, YANG YG, et al. 2011. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated *FTO*. *Chem Biol* 7: 885-887.

- JIA G, YANG C, YANG S, JIAN X, YI C, ZHOU Z, HE C. 2008. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett*. 582: 3313–3319.
- JOHANSSON M, KARLSSON L, WENNERGREN M, JANSSON T, POWELL TL. 2003. Activity and protein expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase are reduced in microvillous syncytiotrophoblast plasma membranes isolated from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2831-2837.
- JOHNSON LW, SMITH CH. 1998. Neutral amino acid transport systems of microvillous membrane of human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*. 254:C773-C780.
- JOHNSON HJ JR, SIMPSON ER, CARR BR, MACDONALD PC, PARKER RC JR. 1982. The levels of plasma cholesterol in the human fetus throughout gestation. *Pediatr Res* 16: 682-683.
- JONES JL, COMPERATORE M, BARONA J, CALLE MC, ANDERSEN C, MCINTOSH M, NAJM W, LERMAN RH, FERNANDEZ ML. 2012. A Mediterranean-style, low-glycemic-load diet decreases atherogenic lipoproteins and reduces lipoprotein (a) and oxidized low-density lipoprotein in women with metabolic syndrome. *Metabolism* 61: 366-372.
- JONES D. 1979. Energy metabolism in developing brain. *Semin Perinatol* 3:121-129.
- JULA A, MARNIEMI J, HUUPPONEN R, VIRTANEN A, RASTAS M, RONNEMAA T. 2002. Effects of diet and simvastatin on serum lipids, insulin and antioxidants in hypercholesterolemic men: a randomized controlled trial. *JAMA* 287: 598-605
- JUONALA M, VIKARI JS, RÖNNEMAA T, MARNIEMI J, JULA A, LOO B-M, RAITAKARI OT. 2008. Associations of dyslipidemias from childhood to adulthood with carotid intima-media thickness, elasticity, and brachial flow-mediated dilatation in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1012-1017.
- JUONALA M, VIKARI JS, RÄSÄNEN L, HELENIUS H, PIETIKÄINEN M, RAITAKARI OT. 2006. Young adults with family history of coronary heart disease have increased arterial vulnerability to metabolic risk factors: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1376-1382.
- KAHN BB, FLIER JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481.
- KALKHOFF RK, JACOBSON M, LEMPER D. 1970. Progesterone, pregnancy and the augment plasma insulin response. *J Clin Endocrinol Metabol* 31: 24-28.
- KARL PI, ALPY KL, FISCHER SE. 1992. Amino acid transport by the cultured human placental trophoblast: effect of insulin on AIB transport. *Am J Physiol* 262:C834-C839.

- KASTORINI CM, MILIONIS HJ, ESPOSITO K, GIUGLIANO D, GOUDEVENOS JA, PANAGIOTAKOS DB. 2011a. The effect of Mediterranean diet on metabolic síndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol* 57: 1299-1313.
- KASTORINI CM, MILIONIS HJ, IOANNIDI A, et al. 2011b. Adherence to the Mediterranean diet in relation to acute coronary syndriomeor stroke nonfatal events: a comparative analysis of a case/case-control study. *Am Heart J* 162:717-724.
- KATAN MB, ZOCK PL, MENSINK RP. 1995. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annu Rev Nutr* 15: 473-493.
- KATZ A, NAMBI SS, MATHER K, BARON AD, FOLLMANN DA, SULLIVAN G, QUON MJ. 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2402-2410.
- KEKKY M. 1980.Lipoprotein lipase action determining plasma high density lipoprotein cholesterol level in adult normolipaemics.*Atherosclerosis* 37: 143-150.
- KELSO GJ, STUART WD, RICHTER RJ, FURLONG CE, JORDAN-STARCK TC, HARMONY JA.1994. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 33: 832-839.
- KENNAUGH J,HAY W.1987.Nutrition of the fetus and newborn.*West J Med* 147:435-448.
- KENNEDY ET, OHLS J, CARLSON S, FLEMING K. 1995. The Healthy Eating Index: design and applications. *J Am Diet Assoc* 95: 1103-1108.
- KEYS A. 1970. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 41 (4) Suppl: I63-I75.
- KEYS A, MENOTTI A, KAROVEN MJ, ARAVANIS C, BLACKBURN H, BUZINA R, DJORDJEVIC BS, DONTAS AS, FIDANZA F, KEYS MH, KROMHOUT D, NEDELJKOVIC S, PUNSAR S, SECCARECCIA F, TOSHIMA H. 1986. The diet and the 15-year death rate in the Seven Countries Study.*Am J Epidemiol* 124: 903-915.
- KEYS A, MENOTTI A, ARAVANIS C, BLACKBURN H, DJORDEVIC BS, BUZINA R, DONTAS AS, FIDANZA F, KARVONEN MJ, KIMURA N et al. 1984. The Seven Countries Study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med* 13: 141-154.
- KHAMSI F, MEKATZ I, SOLOMONS. 1972.The conversion of acetate to cholesterol in the fetus of baboon and the transfer of cholesterol from mother to fetus.*Encodrinology* 91: 6-12.
- KHERKEULIDZE P, JOHANSSON J, CARLSON LA. 1991. High density lipoprotein particle size distribution in cord blood. *Acta Paediatr Scand* 80: 770-779.
- KILPELÄINEN TO, QI L, BRAGE S, SHARP SJ, SONESTEDT E y col. 2011. Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesioty risk: a meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. *PLoS Med* 8:e1001116.



- KIM OY, CHUNG HK, SHIN MJ. 2012. Higher levels of serum triglyceride and dietary carbohydrate intake are associated with smaller LDL particle size in healthy Korean women. *Nutr Res Pract* 6:120-125
- KIMBERLY M, LEARY E, COLE T, WAYMACK P. 1999. Selection, validation standardization and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *Clin Chem* 45: 1803-1812.
- KIRIMI E, CESUR Y, GÜL A .2000. Normal levels of insulin, growth hormone and cortisol levels in venous cord blood of healthy full-term infants: correlation with birthweight and placental weight. *Eastern J Med* 6: 14–17.
- KIRSTEIN D, JOHANSEN KB, PETERSEN MB, ANDERSEN GE. 1985. Changes in plasma lipoproteins from first day to third week of life in healthy breast-fed infants. I. Lipid and protein composition of lipoproteins. *Acta Paediatr Scand* 74: 733-737.
- KNOPP R, HERRERA E, FREINKEL N. 1970. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation. *J Clin Invest* 49: 1438-1446.
- KOHEN-AVRAMOGLU R, THERIAULT A, ADELI K. 2003. Emergence of the metabolic syndrome in childhood: an epidemiological overview and mechanistic link to dyslipidemia. *Clin Biochem* 36: 413-420.
- KOKUBO T, KUSHITANI H, SAKKA S, KITSUGI T, YAMAMURO T. 1990. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* 24: 721-734.
- KONTOGIANNI MD, VIDRA N, FARMAKI AE, KOINAKI S, BELOGIANNI K, SOFRONA S, MAGKANARI F, YANNAKOUILA M. 2008. Adherence rates to the Mediterranean diet are low in a representative sample of Greek children and adolescents. *J Nutr* 138:1951-1956.
- KRIS-ETHERTON PM, PEARSON TA, WAN Y, HARGROVE RL, MORIARTY K, FISHELL V, ETHERTON TD. 1999. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr* 70: 1009-1015.
- KRÖEGERS, HAHN P. 1983. Cholesterol synthesis in the small intestine and adipose tissue of suckling rats. The effects of litter size. *Biol Neonate* 44: 123-128.
- KUDO Y, BOYD CA. 1990. Characterization of amino acid transport systems in human placental basal membrane vesicles. *Biochim. Biophys Acta* 1021:169-174
- KWITEROVICH PO. 2000. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol* 86:5L-10L.
- LABAYEN I, RUIZ JR, ORTEGA FB, GOTTRAND F, HUYBRECHTS I, DALLONGEVILLE J, WIDHALM K, FERRARI M, BUYKEN A, KERSTING M, MOSCHONIS G, TURCK D, GÓMEZ S, SJOSTROM M, MEIRHAEGHE A, MORENO



- LA.2012. Body size at birth modifies the effect of fat mass and obesity associated (FTO) rs9939609 polymorphism on adiposity in adolescents: the Healthy Lifestyle in Europe by nutrition in Adolescence (HELENA) study. *Br J Nutr* 107: 1498-1504.
- LAGER S, POWELL TL. 2012. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* doi 10.1155/2012/179827.
- LAHOZ C, PEÑA R, MOSTAZA JM. 2000. Lípidos, Dieta Mediterránea y Enfermedad Coronaria. *Cardiovasc Risk Factors* 9: 303-309.
- LAMARCHE B, MOORJANI S, LUPIEN PJ, CANTIN B, BERNARD PM, DAGENAIIS GR, DESPRÉS JP. 1996. Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec cardiovascular study. *Circulation* 94: 273-278.
- LANDAUR, LUGIBHLK. 1967. The effects of progesterone on the concentration of plasma aminoacids in man. *Metabolism* 16: 1114-1122.
- LANE DM, MCCONATHY WJ. 1983. Factors affecting the lipid and apolipoprotein levels of cord sera. *Pediatr Res* 17: 83-91.
- LANE DM, MCCONATHY WJ. 1986. Changes in the serum lipids and apolipoproteins in the first four weeks of life. *Pediatr Res* 20: 332-337.
- LANE DM, MCCONATHY WJ, MCCAFREE MA, HALL M. 2002. Cord serum lipid and apolipoprotein levels in preterm infants with the neonatal respiratory distress syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 11:118-25.
- LANGER O, DAMUS K, MAIMAN M. 1986. A link between relative hypoglycemia-hypoinsulinemia during oral glucose tolerance tests and intrauterine growth retardation. *Am J Obstetr Gynecol* 155:711-716.
- LAPPALAINEN T, KOLEHMAINEN M, SCHWAB US, TOLPPANEN AM, STANČÁKOVÁ A, LINDSTRÖM J, ERIKSSON JG, KEINÄNEN-KIUKAANNIEMI S, AUNOLA S, ILANNE-PARIKKA P, HERDER C, KOENIG W, GYLLING H, KOLB H, TUOMILEHTO J, KUUSISTO J, UUSITUPA M; FINNISH DIABETES PREVENTION STUDY GROUP. 2010. Association of the FTO gene variant (rs9939609) with cardiovascular disease in men with abnormal glucose metabolism-The Finnish Diabetes Prevention Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 691-698
- LARQUÉ E, RUIZ-PALACIOS M, KOLETZKO B. 2013. Placental regulation of fetal nutrient supply. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16: 292-297.
- LARQUÉ E, DEMMELMAIR H, GIL-SÁNCHEZ A, PRIETO-SÁNCHEZ MT, BLANCO JE, PAGÁN A, FABER FL, ZAMORA S, PARRILLA JJ, KOLETZKO B. 2011. Placental transfer of fatty acids and fetal implications. *Am J Clin Nutr* 94: 1908S-1913S.

LARSEN LF, JESPERSEN J, MARCKMANN P. 1999. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. *Am J Clin Nutr* 70: 976-982.

LARSON N, STANG J, STORY M. 2011. Developmental origins of childhood obesity: potential public health impact. En: Obesity. Serrano Ríos M, Ordovás JM, Gutiérrez Fuentes JA. (eds). Elsevier. Barcelona. pp. 35-45.

LAстра SÁNCHEZ G, MARTÍNEZ VALVERDE A. 1988 Colesterol total en recién nacidos de bajo peso a lo largo del primer año de vida. *Acta Pediatr Esp* 46: 162-170.

LASUNCIÓN MA. 1988 Modulación de la transferencia de nutrientes de la madre al feto. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera E. (ed). Ceura. Madrid. pp 93-108.

LASUNCIÓN MA, SUÁREZ Y, MARTÍNEZ-BOTAS J, FERRUERO AJ, MARTÍN M, FERNÁNDEZ C, LEDO B, GÓMEZ-CORONADO D. 2000. Papel regulador del colesterol en la proliferación celular. En: Enfermedades cardiovasculares, nutrición, genética y epidemiología. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. de Oya M, Garcés C. (eds). Ediciones Doyma. Madrid. pp. 345-356.

LAUSZUS FF, KLEBE JG, FLYBJERG A. 2001. Macrosomia associated with maternal serum insulin-like growth factor-I and II in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 97:734-741.

LAVIOLA L, PERRINI S, BELSANTI G, NATALICCHIO A, MONTRONE C, LEONARDINI A, VIMERCATI A, SCIOSCIA M, SELVAGGI L, GIORGINO R, GRECO P, GIORGINO F. 2005. Intrauterine growth restriction in humans is associated with abnormalities in placental insulin-like growth factor signaling. *Endocrinology* 146: 1498-1505.

LEE JE, PINTAR J, EFSTRATIADIS A. 1990. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* 110:151-159.

LEONCE J, BROCKTON N, ROBINSON S, VENKATESAN S, BANNISTER P, RAMAN V, MURPHY K, PARKER K, PAVITT D, TEOH TG, REGAN L, BURCHELL A, STEER P, JOHNSTON DG. 2006. Glucose production in the human placenta. *Placenta* 27: 103-108.

LEVITT NS, LAMBERT EV. 2002. The foetal origins of the metabolic syndrome--a South African perspective. *Cardiovasc J S Afr* 13: 179-180.

LIN DS, PITKIN RM, CONNOR WE. 1977. Placental transfer of cholesterol into the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 128: 735-739.

LINDEGAARD ML, WASSIF CA, VAISMAN B, AMAR M, WASMUTH EV, SHAMBUREK R, NIELSEN LB, REMALEY AT, PORTER FD. 2008. Characterization of placental cholesterol transport: ABCA1 is a potential target for in utero therapy of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Hum Mol Genet* 17: 3806-3813.

- LISSAU I, OVERPECK MD, RUAN WJ, DUE P, HOLSTEIN BE, HEDIGER ML; Health Behaviour in School-aged Children Obesity Working Group. 2004. Body mass index and overweight in adolescents in 13 European countries, Israel, and the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 158: 27-33.
- LITHELL H, BOBERG J, HELSING K. 1978. Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and fed states. *Atherosclerosis* 30:89-94.
- LIVESEY G. 2006. A systematic review of the glycaemic response to foods and health. ILSI Europe workshop. Glycaemic response on health. Niza, Francia. 6-8 Diciembre. pp. 82-127.
- LLOBERA M, RAMÍREZ I. 1988. Estructura y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas en la etapa perinatal. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera, E. (ed.). Ceura, Madrid. pp. 319-346.
- LOOKENE A, BECKSTEAD JA, NILSSON S, OLIVECRONA G, RYAN RO. 2005. Apolipoprotein AV-heparin interactions. *J Biol Chem* 27: 25383-25387.
- LÓPEZ BERMEJO A, PETRY CJ, DÍAZ M, SEBASTIANI G, DE ZEGHER F, DUNGER DB, IBÁÑEZ L. 2008. The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1501-1505.
- LÓPEZ-TEJERO D, LLOVERA M, HERRERA E. 1988. Consecuencias del alcohol durante la gestación sobre el desarrollo postnatal. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera E. (ed). Fundación Areces. Ceura. Madrid. pp. 601-627.
- LOUGHREY CM, RIMM E, HEISS G, RIFAI N. 2000. Race and gender differences in cord blood lipoproteins. *Atherosclerosis* 148: 57-65.
- LUC G, BARD JM, ARVEILER D, FERRIERES J, EVANS A, AMOUYEL P, FRUCHART JC, DUCIMETIERE P; PRIME Study Group. 2002. Lipoprotein (a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis* 163: 377-384.
- MACKNESS B, HINE D, LIU Y, MASTORIKOU M, MACKNESS M. 2004. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 680-683.
- MACKNESS B, DURRINGTON PN, MACKNESS MI. 1998a. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 31: 329-336.
- MACKNESS B, MACKNESS MI, ARROL S, TURKIE W, DURRINGTON PN. 1998b. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS* 423: 57-60.
- MACKNESS MI, MACKNESS B, DURRINGTON PN, FOGELMAN AM, BERLINER J, LUSIS AJ, NAVAB M, SHIH D, FONAROW GC. 1998. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 9: 319-324

- MACKNESS MI, ARROL S, ABBOT C, DURRINGTON PN. 1993. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104: 129-135.
- MADSEN EM, LINDEGAARD ML, ANDERSEN CB, DAMM P, NIELSEN LB. 2004. Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 279: 55271–55276.
- MAGNUSSON AL, WATERMAN IJ, WENNERGREN M, JANSSEN T, POWELL TL. 2004. Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4607-4614.
- MAGNUSSON-OLSSON AL, LAGER S, JACOBSSON B, JANSSEN T, POWELL TL. 2007. Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E24-E30.
- MAGNUSSON-OLSSON AL, HALLMARK B, ERICSSON A, WENNERGREN M, JANSSEN T, POWELL TL. 2006. Gestational and hormonal regulation of human placental lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 47: 2551-2561.
- MALANDRO MS, BEVERIDGE MJ, KILBERG MS, NOVAK DA. 1996. Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport. *Am J Physiol* 271:C295-C303.
- MALANDRO MS, BEVERIDGE MJ, KILBERG MS, NOVAK DA. 1994. Ontogeny of cationic amino acid transport systems in rat placenta. *Am J Physiol* 267:C804-C811.
- MALINOW MR, RAJKOVIC A, DUELL PB, Hess DL, Upson BM. 1998. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. *Am J Obstet Gynecol* 178: 228-233.
- MALIQUEO M, ECHIBURÚ B, CRISOSTO N, AMIGO P, ARANDA P, SÁNCHEZ F, SIR-PETERMANN T. 2009. Metabolic parameters in cord blood of newborns of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 92: 277-282.
- MALLOV S, ALOUSI AA. 1965. Lipoprotein lipase activity of rat and human placenta. *Proc Soc Exp Biol Med* 119: 301-306.
- MAR R, PAJUKANTA P, ALLAYEE H, GROENENDIJK M, DALLINGA-THIE G, KRAUSS RM, SINSHEIMER JS, CANTOR RM, DE BRUIN TWA, LUSIS AJ. 2004. Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ Res* 94: 993-999.
- MARÇAIS C, VERGES B, CHARRIÈRE S, PRUNETTA V, MERLIN M, BILLON S, PERROT L, DRAI J, SASSOLAS A, PENNACCHIO LA, FRUCHART-NAJIB J, FRUCHART JC, DURLACH V, MOULIN P. 2005. ApoA5 Q139X

truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* 115: 2862-2869.

MÁRQUEZ-SANDOVAL F, BULLÓ M, VIZMANOS B, CASAS-AGUSTENCH P, SALAS-SALVADÓ J. 2008. Un patrón de alimentación saludable: la dieta mediterránea tradicional. *Antropo* 16: 11-22.

MARTÍN DE SANTA OLALLA L, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, VAQUERO MP. 2009. N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity. *Nutr Hosp* 24: 113-127.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, GARCÍA-LÓPEZ M, BES-RASTROLLO M, TOLEDO E, MARTÍNEZ-LAPISCINA EH, DELGADO-RODRÍGUEZ M, VAZQUEZ Z, BENITO S, BEUNZA JJ. 2010. Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: a Spanish cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21: 237-244

MARTÍNEZ SESMERO JM. 2012. Riesgo cardiovascular en el Estudio Área de Toledo. Facultad de Farmacia. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

MARTÍNEZ-SESMERO JM; SÁNCHEZ MUNIZ F. 2005. Efecto de los hábitos dietéticos sobre los factores de riesgo asociados al síndrome metabólico. *ANS. Alimentación, Nutrición y Salud* 12: 108-112.

MARTÍNEZ SESMERO JM, BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2009. Cardiovascular risk and metabolic syndrome at the Toledo Area Study. *Nutr Hosp* 24: 167-175.

MASSARO M, SCODITTI E, CARLUCCIO MA, DE CATTERINA R. 2006. Epidemiology of olive oil and cardiovascular disease. En: *Olive Oil and Health*. Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Yaqoob P. (eds) CAB International. Oxfordshire, Reino Unido. pp. 152-171.

MATA P, DE OYA M, PÉREZ-JIMÉNEZ F, ROS RAHOLA E. 1994. Dieta y enfermedades cardiovasculares. Recomendaciones de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscler* 6: 43-61.

MATAIX VERDÚ J, ARANDA RAMÍREZ P. 2009. Gestación. En: *Nutrición y alimentación humana. II. Situaciones fisiológicas y patológicas*. Mataix Verdú J. (ed). Ergón. Majadahonda. pp. 1061-1084.

MATAIX VERDÚ J, LLOPIS GONZÁLEZ J. 1993. Manual gráfico e contenido nutricional de pratos galegos. Jiménez Contreras JF, Lendoiro Otero RM, Meniño Olivera MJ (eds.) Consellería de Sanidad, y Carrefour Galicia. Santiago de Compostela.

MATAIX VERDÚ J. (ed) 2003. Tablas de composición de alimentos. Mataix Verdú (ed).Ed. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Granada.

MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419.

MAU G, BRINKMANN G, ANGER H. 1983. Lipoprotein pattern in umbilical cord blood of neonates of smoking and non-smoking mothers. *Acta Paediatr Scand* 72: 755-756.

- MAYOR F, CUEZVA JM, MEDINA JM. 1986. Bioquímica perinatal. En: Bioquímica y biología molecular. Temas de actualidad para graduados. Ochoa S, Leloir LF, Oró J, Sols A. (eds). Salvat Editores. Barcelona. pp. 208-218.
- MCCAFFERY JM, PAPANDONATOS GD, PETER I, HUGGINS GS, RAYNOR HA, DELAHANTY LM, CHESKIN LJ, BALASUBRAMANYAM A, WAGENKNECHT LE, WING RR. GENETIC SUBGROUP OF LOOK AHEAD; LOOK AHEAD RESEARCH GROUP. (297 COLABORADORES). 2012. Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *Am J Clin Nutr* 95: 1477–1486.
- MCCARTY MF. 2004. Proposal for a dietary "phytochemical index". *Med Hypotheses* 63: 813-817.
- MCCONATHY WJ, LANE DM. 1980. Studies on the apolipoproteins and lipoproteins of cord serum. *Pediatr Res* 14: 757-761.
- MCGANITY W, DAWSON EB, VAN HOOK J. 1998. Maternal nutrition. En: Modern Nutrition in health and disease. Shils Me, Olson JA, Shike M, Ross AC (eds). 9ª ed. Lippincott Williams and Wilkins. Filadelfia. pp. 811-838.
- MCGIVAN P, PASTOR-ANGLADA M. 1994. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem J* 299:321-334.
- MCMANUS K, ANTINORO L, SACKS F. 2001. A randomized controlled trial of a moderate-fat, low-energy diet compared with a low fat, low energy diet for weight loss in overweight adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1503-1511.
- MEDINA JM. 1988. Homeostasis energética perinatal. Adaptación metabólica a la vida extrauterina. En: Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos). Herrera, E. (ed.) Ceura. Madrid. pp. 199-226.
- MEIGS JB. 2000. Invited commentary: Insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am J Epidemiol* 152: 908-911.
- MEISER M, AMON I, HÜLLER H. 1982. Enzymatic activity in carbohydrate metabolism in human liver during development. *Int J Biol Res Pregnancy* 3: 4-7.
- MELTZER HM, BRANTSÆTER AL, NILSEN RM, MAGNUS P, ALEXANDER J, HAUGEN M. 2011. Effect of dietary factors in pregnancy on risk of pregnancy complications: results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 94 (6 Suppl): 1970S-1974S.
- MENOTTI A, KEYS A, KROMHOUT D, BLACKBURN H, ARAVANIS C, BLOEMBERG B, BUZINA B, DONTAS A, FIDANZA F, GIAMPAOLI S et al. 1993. Inter-cohort differences in coronary heart disease mortality in the 25-year follow-up of the seven countries study. *Eur J Epidemiol* 9:527-536

- MENSINK RP, ZOCK PL, KESTER AD, KATAN MB. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 77: 1146-1155.
- MENSINK RP, KATAN MB. 1993. Trans monounsaturated fatty acids in nutrition and their impact on serum lipoprotein levels in man. *Prog Lipid Res* 32: 111-22.
- MENTE A, DE KONING L, SHANNON HS, ANAND SS. 2009. A systematic review of the evidence supporting a casual link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 169:659-669.
- MERKEL M, LOEFFLER B, KLUGER M, FABIG N, GEPPERT G, PENNACCHIO LA, LAATSCH A, HEEREN J. 2005. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 280: 21553-21560.
- METTCOFF J, COSTILOE JP, CROSBY W. 1981. Maternal nutrition and fetal outcome. *Am J Clin Nutr* 34:708-721.
- METZGER BE, COUSTAN DR. 1998. Proceedings of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes. *Diabetes Care* 21 (Suppl 2): B1-B167.
- METZGER B, FREINKEL N. 1987. Accelerated starvation in pregnancy: implications for dietary treatment of obesity and gestational diabetes mellitus. *Biol Neonate* 51: 78-85.
- MILLER GE, MILLER NE. 1975. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1: 16-19.
- MILLER HC, HASSANEIN K. 1971. Diagnosis of impaired fetal growth in newborn infants. *Pediatrics* 48: 511-522.
- MIRLESSE V, FRANKENNE F, ALSAT E, PONCELET M, HENNEN G, EVAÏN-BRION D. 1993. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 34:439-442.
- MOLINA M, CASANUEVA V, CID X, FERRADA MC, PÉREZ R, DIOS G, REYES M, VENEGAS H, CID L. 2000. Lipid profile in newborns with intrauterine growth retardation. *Rev Med Chil* 128: 741-748.
- MOORE KL, PERSAUD TVN. 2003. The developing human: clinically oriented embryology. Moore KL (ed). 7ª ed. Saunders WB, Co. Ltd. Filadelfia.
- MOREIRAS-VARELA O, CARVAJAL A, CABRERA L, CUADRADO C. 2008. Tablas de Composición de Alimentos. Ed. Pirámide. Madrid.
- MORRIS F, MAKOWSKY E, MESCHIA G. 1975. The glucose/oxygen quotient of the term human fetus. *Biol Neonate* 25: 44-52.



- MOYER MS, INSLER N, DUMASWALA R. 1992. The role of chloride in taurine transport across human placental brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1109: 74-80.
- MULLER M, KERSTEN S. 2003. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet* 4:315-322.
- MURPHY MM, SCOTT JM, ARIJA V, MOLLOY AM, FERNANDEZ-BALLART JD. 2004. Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 50: 1406-1412.
- MUTCH DM, WAHLI W, WILLIAMSON G. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 19: 1602-1616.
- MYATT L. 2006. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* 572: 25-30.
- NAGASAKA H, CHIBA H, KIKUTA H, AKITA H, TAKAHASHI Y, YANAI H, HUI SP, FUDA H, FUJIWARA H, KOBAYASHI K. 2002. Unique character and metabolism of high density lipoprotein (HDL) in fetus. *Atherosclerosis* 161: 215-223.
- NAPOLI C, GLASS CK, WITZTUM JL, DEUTSCH R, D'ARMIENTO FP, PALINSKI W. 1999. Influence of maternal hypercholesterolemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. *Lancet* 354: 1234-1241.
- NAPOLI C, D'ARMIENTO FP, MANCINI FP, POSTIGLIONE A, WITZTUM JL, PALUMBO G, PALINSKI W. 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100: 2680-2690.
- NAVAB M, BERLINER JA, WATSON AD, HAMA SY, TERRITO MC, LUSIS AJ, SHIH DM, VAN LENTEN BJ, FRANK JS, DEMER LL, EDWARDS PA, FOGELMAN AM. 1996. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 831-842.
- NCEP-ATP III. 2001. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III, or ATP III) *JAMA* 285: 2486-2497.
- NEEL JV. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14: 352-362.
- NESSTRUCK AC, RUBINSTEIN D. 1976. The synthesis of apoproteins of very low density lipoproteins isolated from the Golgi apparatus of rat. *Can J Biochem* 54: 617-628.
- NESTEL PJ, REARDON M, BILLINGTON T. 1979. In vivo transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to very low density lipoproteins in man. *Biochim Biophys Acta* 573: 403-407.



- NEWMAN WP 3<sup>RD</sup>, FREEDMAN DS, VOORS AW, GARD PD, SRINIVASAN SR, CRESANTA JL, WILLIAMSON GD, WEBBER LS, BERENSON GS. 1986. Relation of serum lipoprotein levels and systolic blood pressure to early atherosclerosis. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 314: 138-144.
- NICHOLS AV, GONG EL, BLANCHE PJ. 1981. Interconversion of high density lipoproteins during incubation of human plasma. *Biochem. Biophys Res Commun* 100: 391-399.
- NICULESCU LS, FRUCHART-NAJIB J, FRUCHART JC, SIMA A. 2007. Apolipoprotein A-V gene polymorphisms in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 45: 1133-1139.
- NOBLE RC, SHAND JH. 1983. A comparative study of the distribution and fatty acid composition of the lipoproteins in the fetal and maternal plasma of sheep. *Biol Neonate* 44: 10-20.
- NORBERG S, POWELL TL, JANSSON T. 1998. Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placenta taurine transporters. *Pediatr Res* 44: 233-238.
- NORTE NAVARRO AI, ORTIZ MONCADA R. 2011. Spanish diet quality according to the Healthy Eating Index. *Nutr Hosp* 26: 330-336.
- NOVAK DA, BEVERIDGE MJ, MALANDRO M, SEO J. 1996. Ontogeny of cationic amino acid transport system A in rat placenta. *Placenta* 17: 643-651.
- NOVAKOVIC B, GORDON L, ROBINSON WP, DESOYE G, SAFFERY R. 2013. Glucose as a fetal nutrient: dynamic regulation of several glucose transporter genes by DNA methylation in the human placenta across gestation. *J Nutr Biochem* 24: 282-288.
- NOZAKI S, KUBO M, SUDO H, MATSUZAWA Y, TARUI S. 1986. The role of hepatic triglyceride lipase in the metabolism of intermediate-density lipoprotein--postheparin lipolytic activities determined by a sensitive nonradiosotopic method in hyperlipidemic patients and normals. *Metabolism* 35: 53-58.
- NUS M, RUPERTO M, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2004. Frutos secos y riesgo cardio y cerebrovascular. Una perspectiva española. *Arch Latinoamer Nutr* 54: 137-148.
- NUS M, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, SÁNCHEZ-MONTERO JM. 2006. A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using simulated body fluid. *Atherosclerosis* 188: 155-159.
- O'BRIEN PJ, ALBORN WE, SLOAN JH, ULMER M, BOODHOO A, KNIERMAN MD, SCHULTZE A, KONRAD RJ. 2005. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* 51: 351-359.
- O'SULLIVAN BA, HENDERSON ST, DAVIS JM. 1998. Gestational diabetes. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 38: 364-371, quiz 372-373.

OGURA K, SAKATA M, YAMAGUCHI M, KURACHI H, MURATA Y. 1999. High concentration of glucose decreases glucose transporter-1 expression in mouse placenta in vitro and in vivo. *J Endocrinol* 160: 443-452.

OLIVARES M, ARREDONDO M, PIZARRO F. 2010. Hierro. En: Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Gil A. (ed). Sánchez de Medina (coord). 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 669-686.

OMS. Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*). 1986. Overcoming iodine deficiency disorders. World Health Assembly. Resolution WHA 39.31. Ginebra.

OMS. Organización Mundial de la Salud. 1985. Energy and protein requirements: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO Technical report series 727. Ginebra. pp. 71-80.

OMS. Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*). 1979. Definitions and recommendations. International statistical classification of diseases. 9<sup>th</sup> revision. Ginebra 1: 763-768.

ORDOVÁS JM. 2009. Integración del medio ambiente y la enfermedad en el análisis "ómico". *Rev Esp Cardiol* 62: 17-22.

ORDOVÁS JM, CORELLA D. 2005. Genetic variation and lipid metabolism: modulation by dietary factors. *Curr Cardiol Rep* 7: 480-486.

ORDOVÁS JM, MOOSER V. 2004. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 15: 101-108.

ORDOVÁS JM, CORELLA D. 2004. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 71-118.

ORDOVÁS JM, CORELLA D, DEMISSIE S, CUPPLES LA, COUTURE P, COLTELL O, WILSON PW, SCHAEFER EJ, TUCKER KL. 2002. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism: evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the Framingham Study. *Circulation* 106: 2315-2321.

ORTEGA RM, MENA MC, ANDRÉS P. 2010. Vitamina A. En: Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Gil A. (ed). Sánchez de Medina (coord). 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 547-569.

ORTEGA RM, LÓPEZ-SOBALER AM, ANDRÉS P, REQUEJO AM, APARICIO A, MOLINERO LM. 2004. DIAL software for diet assessment and food calculations. Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid y Alce Ingeniería, S.A. Madrid. <http://www.alceingenieria.net/nutricion.htm>.

ORTEGA AZORÍN C. 2011. Interacción genético-ambiental en la modulación de adipocitoquinas y marcadores de inflamación en su asociación con obesidad y otros factores de riesgo

cardiovascular en población mediterránea. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina Preventiva y salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal. Universidad de Valencia.

ORTEGA-AZORÍN C, SORLÍ JV, ASENSIO EM, COLTELL O, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MÁ, SALAS-SALVADÓ J, COVAS MI, ARÓS F, LAPETRA J, SERRA-MAJEM L, GÓMEZ-GRACIA E, FIOLE M, SÁEZ-TORMO G, PINTÓ X, MUÑOZ MA, ROS E, ORDOVÁS JM, ESTRUCH R, CORELLA D. 2012. Associations of the FTO rs9939609 and the MC4R rs17782313 polymorphisms with type 2 diabetes are modulated by diet, being higher when adherence to the Mediterranean diet pattern is low. *Cardiovasc Diabetol* 6; 11: 137.

OSE L, IDEN A, BAKKE T, AARSKOG D. 1975. Neonatal screening for hyperlipidaemia. *Postgrad Med J* 51: 88-92.

OTT J. LINKUTIL. <http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkutil.htm>. 2004. Laboratorio de Genética Estadística. Universidad Rockefeller. Nueva York.

OZANNE SE, HALES CN. 2002. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 368-373.

PAC-KOZUCHOWSKA E. 2007. Evaluation of lipids, lipoproteins and apolipoprotein concentrations in cord blood serum of newborns from rural and urban environments. *Ann Agr Environ Med* 14: 25-29.

PALACÍN M, LASUNCIÓN M, HERRERA E. 1984. Transporte de metabolitos a través de la placenta. *Rev Esp Pediatr* 40: 163-198.

PALINSKI W, NAPOLI C. 2002. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia and cholesterol-lowering of antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J* 16: 1348-1360.

PALINSKI W, NAPOLI C. 2000. Pathophysiological events during pregnancy influence the development of atherosclerosis in humans. *Trends Cardiovasc Med* 9: 205-214.

PALOU A, BONET ML, PICO C, RODRÍGUEZ AM. 2004. Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48: 36-48.

PARDO IM, GELONEZE B, TAMBASCIA MA, BARROS-FILHO AA. 2005. Atherogenic lipid profile of Brazilian near-term newborns. *Braz J Med Biol Res* 38: 755-760.

PARKER CR JR, FORTUNATO SJ, CARR BR, OWEN J, HANKINGS GD, HAUT JC. 1988. Apolipoprotein A-I in umbilical cord blood of newborn infants: relation to gestational age and high-density lipoprotein cholesterol. *Pediatr Res* 23: 348-351.

PARKS JS, BULLOCK BC. 1987. Effect of fish oil versus lard diets on the chemical and physical properties of low density lipoproteins of nonhuman primates. *J Lipid Res* 28: 173-182.

- PASCUAL-LEONE AM, MEDINA JM (eds). 2008. Desarrollo perinatal: Origen de patologías adultas. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXIII. Madrid.
- PATEL MS, VAN LELYVELD P, HANSON RW. 1982. The development of the pathways of glucose homeostasis in the. En: The biochemical development of the fetus and neonate. Jones CT. (ed). Elsevier Biomedical Press. Nueva York. pp. 553-572.
- PATSCH RJ, GOTTO AM JR, OLIVECRONA T, EISENBERG S. 1978. Formation of high density lipoprotein 2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4519-4523.
- PDB (PROTEIN DATA BANK). 2004.  
<http://www.rcsb.org/pdb/navbarsearch.do?newSearch=yes&isAuthorSearch=no&radioSet=All&inputQuickSearch=1v04>
- PENNACCHIO LA, OLIVIER M, HUBACEK JA, COHEN JC, COX DR, FRUCHART JC, KRAUSS RM, RUBIN EM. 2001. An apolipoprotein influencing triglycerides in human and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294:169-173.
- PEREA S. 1994. Perfil antropométrico y lipoproteico de los neonatos del estudio "Área de Toledo". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- PÉREZ-LÓPEZ FR, CHEDRAUI P, HAYA J, CUADROS JL. 2009. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 64: 67-79.
- PÉREZ MARAVER M, MONTANYA MIAS E. 2001. Técnicas para el estudio de la resistencia insulínica. Una valoración crítica. *Av Diabetol* 17: 179-186.
- PHILLIPS C, LÓPEZ-MIRANDA J, PÉREZ-JIMÉNEZ F, MCMANUS R, ROCHE HM. 2006. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 21: 185-193.
- PHILLIPS AF, HOLZMAN IR, TENG C, BATTAGLIA FC. 1978. Tissue concentrations of free amino acids in term human placentas. *Am J Obstet Gynecol* 131: 881-887.
- PIERS LS, WALKER KZ, STONEY RM, SOARES MJ, O'DEA K. 2003. Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. *Br J Nutr* 90: 717-727.
- PINEDA M, FERNÁNDEZ E, TORRENTS D, ESTÉVEZ R, LÓPEZ C, CAMPS M, LLOBERAS J, ZORZANO A, PALACÍN M. 1999. Identification of a membrane protein LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, a L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274: 19738-19744.
- PITKIN RM, CONNOR WE, LINS DS. 1972. Cholesterol metabolism and placental transfer in the pregnant Rhesus monkey. *J Clin Invest* 51: 2584-2592.

- PLAZA PÉREZ I, VILLAR ÁLVAREZ F, MATA LÓPEZ P, PÉREZ JIMÉNEZ F, MAIQUEZ GALÁN A, CASASNOVAS LENGUAS JA, BANEGAS BANEGAS JR, TOMÁS ABADAL L, RODRÍGUEZ ARTALEJO F, GIL LÓPEZ E. 2000. Control of cholesterolemia in Spain, 2000. A tool for cardiovascular prevention. *Rev Esp Cardiol* 53: 815-837.
- POCOVÍ M. 1988. Metabolismo lipídico en recién nacidos prematuros. En: *Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos)*. Herrera, E. (ed.) Ceura. Madrid. pp. 857-888.
- POIRIER J, COHEN I, BAUDET J. 1974. La placenta. En: *Embriología Humana*. Gómez Sánchez J. (revisor). Editorial Marban. Madrid. pp. 77-91.
- POIRIER J, COHEN I, BAUDET J. 1974b. El intestino primitivo y sus derivados. En: *Embriología Humana*. Gómez Sánchez J. (revisor). Editorial Marban. Madrid. pp. 111-130.
- PORITSANOS NJ, LEW PS, FISCHER J, MOBBS CV, NAGYJI, WONG D, RÜTHER U, MIZUNO TM. 2011. Impaired hypothalamic *Fto* expression in response to fasting and glucose in obese mice. *Nutr Diabetes* 1:e19.
- POTAU N, RIUDOR E, BALLABRIGA A. 1981. Insulin receptors in human placenta in relation to fetal weight and gestational age. *Pediatr Res* 15: 798-802.
- POTTER JM. 1977. Perinatal plasma lipid concentrations. *Aust N Z J Med* 7: 155-160.
- POVEL CM, BOER JM, REILING E, FESKENS EJ. 2011. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes Rev* 11:952-967.
- PREEDY R, WATSON RR (eds). 2015. *The Mediterranean diet. An Evidence-Based Approach*. Elsevier Inc. Amsterdam.
- PULIDO R, HERNÁNDEZ-GARCÍA M, SAURA-CALIXTO F. 2003. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 57: 1275-1282.
- QUERO-JIMÉNEZ J. 1988. Situaciones de riesgo para el cerebro en el periodo perinatal. En: *Bioquímica perinatal. (Aspectos básicos y patológicos)*. Herrera E. (ed). Ceura. Madrid. pp. 1027-1043.
- RAITAKARI OT, PORKKA KV, RÖNNEMAA T, KNIP M, UHARI M, AKERBLOM HK, VIKARI JS. 1995. The role of insulin in clustering of serum lipids and blood pressure in children and adolescents. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Diabetologia* 38: 1042-1050.
- RAJARAM OV, WITHE GH, BARTER PJ. 1980. Partial purification and characterization of a triacylglycerol-transfer protein from rabbit serum. *Biochim Biophys Acta* 617:383-392.
- RAMÍREZ I, LLOBERA M, HERRERA E. 1983. Circulating triacylglycerols, lipoproteins and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. *Metabolism* 32: 333-341.

- RAMÓN Y CAJAL J, POCOVÍ M, ROMERO MA, JIMÉNEZ D, MARTÍNEZ H, GRANDE F. 1988. Plasma lipids and high density lipoprotein cholesterol in maternal and umbilical vessels in twin pregnancies. *Artery* 15: 109-117.
- RAMÓN Y CAJAL J, POCOVÍ M, JIMÉNEZ D, ROMERO MA, DE AGÜERO RG, MARTÍNEZ H, GRANDE F. 1985. Plasma lipids, apolipoproteins A and B in maternal and umbilical vessels in term pregnancies. *Artery* 13: 32-40.
- RAMPERSAUD E, MITCHELL BD, POLLIN TI, FU M y col. 2008. Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Arch Intern Med* 168: 1791-1797.
- RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN, NEWSHOLME EA. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
- RAZQUIN C, MARTINNEZ JA, MARTINEZ GONZALEZ MA, BES-RASTROLLO M y col. 2010. A 3-year intervention with Mediterranean diet modified the association between the rs9939609 gene variant FTO and body weight changes. *Int J Obes* 34: 266-272.
- REAVEN GM. 1988. Banting lecture. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.
- REDLINE RW, CHERNICKY CL, TAN HQ, ILAN J, ILAN J. 1993. Differential expression of insulin-like growth factor II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. *Mol Reprod Dev* 36: 121-129.
- REGNAULT TR, FRIEDMAN JE, WILKENING RB, ANTHONY RV, HAY WW JR. 2005. Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR- a review. *Placenta* 26 Suppl A: S52-62.
- REICHMAN B, CHESSEX P, PUTET G, VERELLEN G, SMITH JM, HEIM T, SWYER PR. 1981. Diet, fat accretion and growth in premature infants. *N Engl J Med* 305: 1495-1500.
- REUSENS B, REMACLE C. 2006. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 913-922.
- RICHARD C, COUTURE P, LAMARCHE B. 2015. Impact of the Mediterranean diet on features of metabolic syndrome: is weight loss required?. En: The Mediterranean diet. An Evidence-Based approach. Preedy VR, Watson RR (eds). Elsevier Inc. Amsterdam. pp. 325-335.
- RICHARD C, COUTURE P, DESROCHES S, CHAREST A, LAMARCHE B. 2011. Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on cardiovascular risk factors in men with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovascular Dis* 21: 628-635.
- RIFAI N, KING ME. 1986. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, A-I, A-II and B in serum. *Clin Chem* 32: 957-961.

- RIFAI N, HEISS G, DOETSCH K. 1992. Lipoprotein (a) at birth, in blacks and whites. *Atherosclerosis* 92: 123-129.
- RIVERO M. 1993. Alimentación y nutrición durante el embarazo. En: Nutrición y dietética. Aspectos sanitarios. Mataix J (coord). PLENUFAR.CGCOF. Madrid. pp. 361-379.
- RODRIGUES SS, CARAHER M, TRICHOPOULOU A, DE ALMEIDA MD. 2008. Portuguese households' diet quality (adherence to Mediterranean food pattern and compliance with WHO population dietary goals): trends, regional disparities and socioeconomic determinants. *Eur J Clin Nutr* 62:1263-1272.
- RODRÍGUEZ ARTALEJO F, GUALLAR-CASTILLON P, BANEGAS BANEGAS JR, MANZANO BA, DEL REY CALERO J. 1998. Consumption of fruit and wine and the decline in cerebrovascular disease mortality in Spain (1975-1993). *Stroke* 29: 1556-1561.
- RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, GONZÁLEZ-CARPIO M, SERRANO MV, TORRES G, GARCÍA DE CÁCERES MT, HERRERA T, ROMÁN A, RUBIO M, MÉNDEZ P, HERNÁNDEZ-SÁEZ R, NÚÑEZ M, LUENGO LM. 2010. Association of FTO gene polymorphisms and morbid obesity in the population of Extremadura (Spain). *Endocrinol Nutr* 57: 203-209.
- RODRÍGUEZ SINOVAS C. 2011. El microRNA-758 regula el eflujo de colesterol a través de la represión post-transcripcional del transportador ATP binding cassette Transporter A1. *Clínica e investigación en Arteriosclerosis* 23: 292-293.
- ROESCHLAU P, BERNT E, GRUBER W. 1974. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 12: 226.
- ROMERO P, RIZVI SS, KELLY ML, BAUMAN DE. 2000. Short communication: concentration of conjugated linoleic acid from milk fat with a continuous supercritical fluid processing system. *J Dairy Sci* 83:20-2.
- ROS E. 2001. Guía para una alimentación cardiosaludable. Aporte de grasa. Guías alimentarias para la población española. Recomendaciones para una dieta saludable. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. IM&C, S.A. Madrid.pp. 413-421.
- ROSS R. 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115–126.
- ROUX JF, YOSHIOKA T. 1970. Lipid metabolism in the fetus during development. *Clin Obstet Gynecol* 13: 595-620.
- ROUX JF, TAKEDA Y, GRIGORIAN A. 1971. Lipid concentration and composition in human fetal tissue during development. *Pediatrics* 48: 540-546.
- ROZENBERG O, ROSEMBLAT M, COLEMAN R, SHIH DM, AVIRAM M. 2003a. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med* 34: 774-784.



- ROZENBERG O, SHIH DM, AVIRAM M. 2003b. Human serum paraoxonase decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 23: 461-467.
- RUIZ-ROSO CALVO DE MORA B. 2013. Hidratos de carbono y fibra dietética. En: Libro blanco de la nutrición en España. Fundación Española de la Nutrición. Varela Moreiras (coordinador general). Fundación Española de la Nutrición. Madrid. pp. 135-143.
- RYAN EA. 2003. Hormone and insulin resistance during pregnancy. *Lancet* 362: 1777-1778.
- RZEHA P, SCHERAG A, GRALLERT H, SAUSENTHALLER S, KOLETZKO S, BAUER CP, SCHAAF B, VON BERG A, BERDEL D, BORTE M, HERBARTH O, KRÄMER U, ILLIG T, WICHMANN HE, HEBEBRAND J, HEINRICH J; GINI and LISA Study Group. 2010. Associations between BMI and the FTO gene are age dependent: results from the GINI and LISA birth cohort studies up to age 6 years. *Obes Facts* 3:173-180.
- SABATÉ J, ROS E, SALAS-SALVADÓ J. 2006. Nuts: nutrition and health outcomes. Preface. *Br J Nutr* 96: S1-S2.
- SAKAMOTO K, MC CARTHY A, SMITH D, GREEN KA, GRAHAME HARDIE D, ASHWORTH A, ALESSI DR. 2005. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 24: 1810-1820.
- SALAS-SALVADÓ J, BULLÓ M, BABIO N, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MÁ, IBARROLA-JURADO N, BASORA J, ESTRUCH R, COVAS MI, CORELLA D, ARÓS F, RUIZ-GUTIÉRREZ V, ROS E; PREDIMED Study Investigators. 2011. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care* 34: 14-19.
- SALAS-SALVADÓ J, FERNÁNDEZ-BALLART J, ROS E, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA, FITÓ M, ESTRUCH R, CORELLA D, FIOL M, GÓMEZ-GRACIA E, ARÓS F, FLORES G, LAPETRA J, LAMUELA-RAVENTÓS R, RUIZ-GUTIÉRREZ V, BULLÓ M, BASORA J, COVAS MI; PREDIMED STUDY INVESTIGATORS. 2008. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med* 168: 2449-2458.
- SALAS-SALVADÓ J, BULLÓ M, PÉREZ-HERAS A, ROS E. 2006. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr* 96 Suppl 2: S46-S51.
- SALMERÓN J, HU FB, MANSON JE, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, RIMM EB, WILLETT WC. 2001. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr* 73: 1019-1026.
- SALTIEL AR, KAHN CR. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- SÁNCHEZ-BENITO JL, SÁNCHEZ-SORIANO E, GINART SUÁREZ J. 2009. Assessment of the Mediterranean Diet Adequacy Index of a collective of young cyclists. *Nutr Hosp* 24:77-86.



SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2013. Nutrición y felicidad. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2012. Dietary fiber and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 27: 40-54.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2007. Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *An R Ac Nac Far* 73: 653-692.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, BASTIDA S. 2013. Lípidos. En: Libro blanco de la nutrición en España. Fundación Española de la Nutrición. Varela Moreiras G (coordinador general). Fundación Española de la Nutrición. Madrid. pp. 113-124.

SÁNCHEZ MUNIZ FJ, Nus M. 2008. Importancia de la interacción dieta-genética en la prevención cardiovascular. En: Genética, nutrición y enfermedad. Vaquero P (coordinadora general). Instituto Tomás Pascual Sanz y CSIC. EDIMSA. Madrid. pp. 127-144.

SÁNCHEZ-MUNIZ, FJ; BOCANEGRA, A.; BENEDÍ, J. Y BASTIDA, S. 2013b "Algae and cardiovascular health". Parte II. Biological properties of algae and algal components. En: "Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals." Domínguez, H. (ed). Woodhead Publishing. Cambridge. pp. 369-415.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, GESTEIRO E, ESPÁRRAGO RODILLA M, RODRÍGUEZ BERNAL B, BASTIDA S. 2013a. La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutr Hosp* 28: 250-274.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, GARCÍA LINARES MC, GARCÍA ARIAS MT, BASTIDA S, VIEJO J. 2003. Fat and protein from olive oil fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr* 233: 2302-2308.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, BASTIDA S, PEREA S, CUESTA C, ARAGONÉS A. 1997. Low density lipoprotein in neonates with high cord serum cholesterol levels. *Acta Paediatr* 86: 414-418.

SÁNCHEZ-MUNIZ FJ, CUESTA C, BASTIDA S, PEREA S, MOYA P. 1994. Perfil lipoproteico en una muestra seleccionada de neonatos a término del Estudio Toledo. *An Esp Pediatr* 40: 173-180.

SÁNCHEZ DE MEDINA F. 2010. Metabolismo del alcohol y de otros componentes de los alimentos. En: Tratado de nutrición. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Gil A. (ed). Sánchez de Medina (coord). 2ªed. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid. pp.735-747

SÁNCHEZ POZO A, GIL HERNÁNDEZ A. 2010. Metabolismo de las lipoproteínas. En: Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Gil A (ed). Sánchez de Medina F (coord). 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid. pp. 272-273.

SÁNCHEZ-TAINTA A, ESTRUCH R, BULLÓ M, CORELLA D, GÓMEZ-GRACIA E, FIOL M, ALGORTA J, COVAS MI, LAPETRA J, ZAZPE I, RUIZ-GUTIÉRREZ V, ROS E, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA; PREDIMED group.

- Collaborators (9) SAEZ G, CONDE-HERRERA M, SERRA M, VINYOLÉS E, Díez-ESPINO J, LAMUELA RM, SERRA-MAJEM L, PINTÓ X, MITJAVILA MT. 2008 Adherence to a Mediterranean-type diet and reduced prevalence of clustered cardiovascular risk factors in a cohort of 3,204 high-risk patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15: 589-593.
- SANDER M, GERMANS MS. 1997. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 75: 327-340.
- SAYAGO-AYERDI SG, VAQUERO P, SCHULZ-MOREIRA A, BASTIDA S, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 2008. Utilidad y controversia del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutr Hosp* 23: 265-276.
- SCHAAP FG, NIERMAN MC, BERBEÉ JF, HATTORI H, TALMUD PJ, VAESSEN SF, RENSEN PC, CHAMULEAU RA, KUIVENHOVEN JA, GROEN AK. 2006. Evidence for a complex relationship between apo A-V and apo C-III with severe hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 47: 2333-2339.
- SCHMIDT FH. 1961. Enzymatic determination of glucose and fructose simultaneously. *Klin Wochenschr* 39: 1244-1247.
- SCHNEIDER H, MÖHLEN KH, CHALLIER JC, DANCIS J. 1979. Transfer of glutamic acid across the human placenta perfused in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 86: 299-306.
- SCHRÖDER H. 2007. Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem* 18: 149-160.
- SCIULLO E, CARDELLINI G, BARONI M, TORRESI P, MAZZIOTTI F, POZZILLI P, FALLUCCA F. 1997. Glucose transporters (GLUT-1, GLUT-3) mRNA in human placenta of diabetic and non-diabetic pregnancies. *Ann Ist Super Sanita* 33:361-365.
- SCUTERI A, SANNA S, CHEN WM, UDA M, ALBAI G, STRAIT J, NAJJAR S, NAGARAJA R, ORRÚ M, USALA G, DEI M, LAI S, MASCHIO A, BUSONERO F, MULAS A, EHRET GB, FINK AA, WEDER AB, COOPER RS, GALAN P, CHAKRAVARTI A, SCHLESSINGER D, CAO A, LAKATTA E, ABECASIS GR. 2007. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 3: e115.
- SECKL JR. 2004. Perinatal glucocorticoids and long term programming. *Eur J Endocrinol* 151: Suppl 3: U49-U62.
- SECKL JR. 1998. Physiologic programming of the fetus. *Clin Perinatol* 25:939-964.
- SEGAWA H, FUKASAWA Y, MIYAMOTO K, TAKEDA E, ENDOU H, KANAI Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 19745-19751.

SEN. Sociedad Española de Nutrición. Departamento de Nutrición. Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población Española (revisadas en 2008). En: Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C.(eds). Tablas de Composición de Alimentos. Pirámide. Madrid.

SENC. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. 2004. La Guía de la Alimentación Saludable Nueva Pirámide de la Alimentación.

[www.portalesmedicos.com/noticias/guia\\_alimentacion.htm](http://www.portalesmedicos.com/noticias/guia_alimentacion.htm) y

[www.ucm.es/info/nutri1/.../PiramideRecomendadaSENC](http://www.ucm.es/info/nutri1/.../PiramideRecomendadaSENC) 2004.

SERRA-MAJEM L. 2001. Vitamin and mineral intakes in European children. Is food fortification needed? *Public Health Nutr* 4: 101-107.

SERRA-MAJEM L, ARANCETA BARTRINA J. 2002. Alimentación infantil y juvenil. Estudio enKid. Ed Masson. Barcelona.

SERRA-MAJEM L, TRICHOPOULOU A, NGO DE LA CRUZ J, CERVERA P, GARCÍA ÁLVAREZ A, LA VECCHIA C, LEMTOUNI A, TRICHOPOULOS D; International Task Force on the Mediterranean Diet. 2004 Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated? *Public Health Nutr* 7: 927-929.

SERRA-MAJEM L, NGO DE LA CRUZ J, RIBAS L, TUR JA. 2003a. Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* 57 Suppl 1: S2-S7.

SERRA-MAJEM L, RIBAS BARBA L, ARANCETA BARTRINA J, PÉREZ RODRIGO C, SAAVEDRA SANTANA P, PEÑA QUINTANA L. 2003b. Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Med Clin (Barc)* 121: 725-732.

SERRANO GARCÍA MA. 2008. Papel de la placenta en el desarrollo fetal y en la salud del adulto. En: Desarrollo perinatal: Origen de las patologías adultas. Instituto de España. RANF. Monografía XXIII. Pascual-Leone AM, Medina JM. (eds). Madrid. pp. 171-185.

SERRANO RÍOS M, GUTIÉRREZ FUENTES JA. 2011. Obesity and Type 2 Diabetes mellitus. The reciprocal impact. En: Obesity. Serrano Ríos M, Ordovás JM, Gutiérrez Fuentes JA. (eds). Elsevier. Barcelona. pp. 215-232.

SERRANO RÍOS M, REVIRIEGO J, GUTIÉRREZ FUENTES JA. 2010. Classification of Diabetes mellitus: Criteria for diagnosis. En: Type 2 Diabetes Mellitus. SerranoRíos M, Gutiérrez Fuentes JA. (eds). Elsevier. Barcelona. pp. 1-23.

SHAND JH, NOBLE RC. 1979. The role of maternal tryglicerides in the supply of lipids to the ovine fetus. *Res Vet Sci* 26: 117-119.

SHIH DM, XIA YR, WANG XP, MILLER E, CASTELLANI LW, SUBBANAGOUNDER G, CHEROUTRE H, FAULL KF, BERLINER JA, WITZTUM JL, LUSIS AJ. 2000. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 275: 17527-17535.

- SHIMURA Y, TANAKA T, OHTANI H. 1997. Lipoprotein (a) concentrations and apolipoprotein (a) phenotype frequencies in cord blood of newborn infants and sera of children in Japan. *Rinsho Byori* 45: 255-259.
- SHIPCHANDLER MT, MOORE EG. 1995. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem* 41: 991-994.
- SHU X, CHAN J, RYAN RO, FORTE TM. 2007. Apolipoprotein AV association with intracellular lipid droplets. *J Lipid Res* 48:1445-1450.
- SIBLEY C, GLAZIER J, D'SOUZA A. 1997. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp Physiol* 82: 389-402.
- SIBLEY C, TURNER MA, CETIN I, AYUK P, BOYD CA, D'SOUZA SW, GLAZIER JD, GREENWOOD SL, JANSSON T, POWELL T. 2005. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res* 58: 827-832.
- SIBLEY CP, COAN PM, FERGUSON-SMITH AC, DEAN W, HUGHES J, SMITH P, REIK W, BURTON GJ, FOWDEN AL, CONSTÂNCIA M. 2004. Placental-specific insulin growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8204-8208.
- SIEDEL J, SCHEIFER S, ROSSENEU M, BERGEAUD R, DE KEERSGIETER W, PAUTZ B, VINAIMONT N, ZIEGENHORN J. 1988. Immunoturbidimetric method for routine determinations of apolipoproteins, A I, A II and B in normo- and hiperlipemic sera compared with immunonephelometry. *Clin Chem* 34: 1821-1825.
- SIEKMEIER R, MÄRZ W, SCHARNAGL H, NAUCK, M, MAYER H, WIELAND H, GROß W, SEIFFERT UB. 1996. Bestimmung von Lipoprotein(a): Vergleich eines neuen latexverstärkten immunoturbidimetrischen Assay mit einem immunoradiometrischen Assay. *J Lab Med* 20: 294-300.
- SILVESTRE CASTELLÓ D. 2013. Salud nutricional de la mujer gestante y lactante. En: Libro blanco de la nutrición en España. Fundación Española de la Nutrición. Varela Moreiras G. (coord). Fundación Española de la Nutrición. Madrid. pp. 47-54.
- SIMOPOULOS AP. 2010. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 785-795.
- SMITH CE, ARNETT DK, CORELLA D, TSAI MY, LAI CQ, PARNELL LD, LEE YC, ORDOVÁS JM. 2012. Perilipin polymorphism interacts with saturated fat and carbohydrates to modulate insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22: 449-455.
- SMOLIN LA, GROSVENOR MB. 2000. In the beginning: Nutrition for mothers and infants. En: Nutrition: Science and applications. Saunders Collegue Publishing. Orlando, Florida. 3ª ed. pp. 423-459.

- SOFI F. 2009. The Mediterranean diet revisited: evidences of its effectiveness grows. *Curr Opin Cardiol* 24: 442-446.
- SOFI F, ABBATE R, GENSINI GF, CASINI A. 2010. Accruing evidence on benefits of adherence to Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 92: 1189-1196.
- SOFI F, CESARI F, ABBATE R, GENSINI GF, CASINI A. 2008. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* 11: 337-344.
- SOLANKI N, REQUENA JIMÉNEZ A, D'SOUZA SW, SIBLEY CP, GLAZIER JD. 2010. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta* 31: 134-143.
- SOLÉRE M, HAEGEL P. 1970. Embriología. En: Cuadernos prácticos Vol II. Tuchmann-Duplessis E. (ed). Toray Masson, S.A. Barcelona. pág 35.
- SONESTEDT E, ROOS C, GULLBERG B, ERICSON U, WIRFÄLT E, ORHO-MELANDER M. 2009. Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the FTO genotype and obesity. *Am J Clin Nutr* 90: 1418-1425.
- SPEAKMAN JR, RANCE KA, JOHNSTONE AM. 2008. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity* 16: 1961-1965.
- SPENCER JA, CHANG TC, CROOK D, PROUDLER A, FELTON CV, ROBSON SC, HAUESLER M. 1997. Third trimester fetal growth and measures of carbohydrate and lipid metabolism in umbilical venous blood at term. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 76: F21-F25.
- SRINIVASAN SR, BERENSON GS. 1995. Serum apolipoproteins A-I and B as markers of coronary artery disease risk in early life: The Bogalusa Heart Study. *Clin Chem* 41: 159-164.
- STAMPFER MJ, SACKS FM, SALVINI S, WILLET WC, HENNEKENS CH. 1991. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N England J Med* 325: 373-381.
- STEGEMAN HJ. 1975. Placental development in the sheep and its relation to fetal development. *Bijdragen V Dierkunde* 44: 3-73.
- STRACZKOWSKI M, STEPIEN A, KOWALSKA I, KINALSKA I. 2004. Comparison of simple indices of insulin sensitivity using the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique. *Med Sci Monit* 10: CR480-CR484.
- STRATIGOPOULOS G, PADILLA SL, LEDUC CA, WATSON E, HATTERSLEYAT, MCCARTHY MI, ZELTSER LM, CHUNG WK, LEIBEL RL. 2008. Regulation of *Fto/Ftm* gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1185-R1196.

- SUGUICHI H, UJI Y, OKABE H, IRIE T, UEKAMA K, KAYAHARA N, MIYAUCHI K. 1995. Direct measurement of high density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated  $\alpha$ -cyclodextrin. *Clin Chem* 41: 717-723.
- SZABO AJ, GRIMALDI D, DE LELLIS R. 1973. Triglyceride synthesis by the human placenta. II. The effect of cyanide and fluoride on the incorporation of labeled palmitate into placental triglycerides. *Am J Obstet Gynecol* 115: 263-266.
- TALL AR, GREEN PH, GLICKMAN RM, RILEY JW. 1979. Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. *J Clin Invest* 64: 977-989.
- TALMUD PJ, COOPER JA, HATTORI H, MILLER IP, MILLER GJ, HUMPHRIES SE. 2006. The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Nortwick Park Heart Study II. *Diabetologia* 49: 2337-2340.
- TAMARGO MENÉNDEZ J. 2008. Alteraciones cardiovasculares adultas de origen perinatal. Origen fetal de ECV. En: Desarrollo perinatal: Origen de las patologías adultas. Instituto de España. RANF. Monografía XXIII. Pascual-Leone AM, Medina JM. (eds). Madrid. pp. 131-168.
- TANI S, SAITO Y, ANAZAWA T, KAWAMATA H, FURUYA S, TAKAHASHI H, IIDA K, MATSUMOTO M, WASHIO T, KUMABE N, NAGAO K, HIRAYAMA A. 2011. Low-density lipoprotein cholesterol/apolipoprotein B ratio may be a useful index that differs in statin-treated patients with and without coronary artery disease: A case control study. *Int Heart J* 52: 343-347.
- TEN S, MACLAREN N. 2004. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2526-2539.
- TEPSTRA AH. 2004. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *Am J Clin Nutr* 79: 352-361.
- THISSEN JP, KETELSLEGERS JM, UNDERWOOD LE. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15: 80-101.
- THOMPSON GN, HALLIDAY D. 1992. Protein turnover in pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 46: 411-417.
- THOMPSON JL, MANORE MM, VAUGHAN LA. 2008. La nutrición en el ciclo vital: embarazo y primer año de vida. En: Nutrición. Thompson JL, Manore MM, Vaughan LA (eds). Pearson Education S.A. Madrid. pp. 699-751.
- THUREEN PJ, TREMBLER KA, MESCHIA GMAKOWSKI EL, WILKENING RB. 1992. Placental glucose transport in heat-induced fetal growth retardation. *Am J Physiol* 263: R578-R585.
- TIMMERMANS S, STEEGERS-THEUNISSEN RP, VUJKOVIC M, DEN BREEIJEN H, RUSSCHER H, LINDEMANS J, MACKENBACH J, HOFMAN A, LESAFFRE EE, JADDOE VV, STEEGERS EA. 2012. The Mediterranean diet and fetal size parameters: the Generation R Study. *Br J Nutr* 108: 1399-1409.

- TIRET L. 2002. Gene-environment interactions: a central concept in multifactorial diseases. *Proc Nutr Soc* 61:457-463.
- TOPIC A, SPASOJEVIC KALIMANOVSKA V, ZELJKOVIC A, VEKIC J, JELIC IVANOVIC Z. 2008. Gender-related effect of apo E polymorphism on lipoprotein particle sizes in the middle-aged subjects. *Clin Biochem* 41:361-367.
- TORÚN B, CHEW F. 1994. Protein-energy malnutrition. En: Modern nutrition in health and disease. Shils ME, Olson JA, Shike M. (eds). 8<sup>a</sup> ed. Lea & Febiger. Filadelfia. pp. 950-976.
- TRICHOPOULOU A, COSTACOU T, BAMIA C, TRICHOPOULOS D. 2003. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Eng J Med* 348: 2599-2608.
- TRINDER P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Ann Clin Biochem* 6: 24-27.
- TSANG RC, GLUECK CJ. 1975. Perinatal cholesterol metabolism. *Clin Perinatol* 2: 275-294.
- TSANG RC, FALLAT RW, GLUECK CJ. 1974. Cholesterol at birth and age 1: comparison of normal and hypercholesterolemic neonates. *Pediatrics* 53: 458-470.
- TSIMIKAS S, PHILIS-TSIMIKAS A, ALEXOPOULOS S, SIGARI F, LEE C, REAVEN PD. 1999. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 122-130.
- TSITSIOU E, SIBLEY CP, D'SOUZA SW, CATANESCU O, JACOBSEN DW, GLAZIER JD. 2011. Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta. *J Inherit Metab Dis* 34: 57-65.
- TUNG YC, AYUSO E, SHAN X, BOSCH F, O'RAHILLI S, COLL AP, YEO GS. 2010. Hypothalamic specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One* 5: e8771.
- TUR JA, BIBILONI MM, SUREDA A, PONS A. 2012. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *Br J Nutr* 107 Suppl 2:S23-S52.
- UKKOLA O, BOUCHARD C. 2001. Clustering of metabolic abnormalities in obese individuals: the role of genetic factors. *Ann Med* 33:79-90.
- UNESCO. 2010. Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity. <http://www.unesco.org/culture/ich/en/RL/00394>. (consultada en abril de 2011)
- URIEL J. 1961. Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum. *Ann Inst Pasteur* 101:104-119.



VAESSEN SF, SCHAAP FG, KUIVENHOVEN JA, GROEN AK, HUTTEN B, BOEKHOLDT M, HATTORI H, SANDHU MS, BINGHAM SA, LUBEN R, PALMEN JA, WAREHAM NJ, HUMPHRIES SE, KASTELEIN JJ, TALMUD PJ, KHAW KT. 2006. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 47: 2064-2070.

VALCARCE C, CUEZVA JM, MEDINA JM. 1985. Increased gluconeogenesis in the rat at term gestation. *Life Sciences* 37: 553-560.

VALENZUELA BONANOME A, Y UAUY DAGACH R. 2010. Funciones y metabolismo de los ácidos grasos esenciales y de sus derivados activos. En: Tratado de nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Sánchez Medina (coord). Editorial Médica Panamericana. Madrid. pp. 303-320.

VAN AERDE JE, FELDMAN M, CLANDININ MT. 1998. Accretion on lipid in the fetus and newborn. En: Fetal and neonatal physiology. Polin RA, Fox W. (eds) Saunders WB.Co, Ltd. Filadelfia.pp.458-477.

VAN BIERVLIET JP, VINAIMONT N, CASTER H, ROSSENEU M, BELPAIRE F. 1982. A screening procedure for dyslipoproteinemia in the newborn. Apoprotein quantification on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 120: 191-200.

VAN BIERVLIET JP, VINAIMONT N, CASTER H, VERCAEMST R, ROSSENEU M. 1981. Plasma apoprotein and lipid patterns in newborns: influence of nutritional factors. *Acta Paediatr Scand* 70: 851-856.

VAN BIERVLIET JP, VERCAEMST R, DE KEERSGIETER W, VINAIMONT N, CASTER H, ROSSENEU M. 1980. Evolution of lipoprotein patterns in newborns. *Acta Paediatr Scand* 69: 593-596.

VAN DER GAAG MS, UBBINK JB, SILLANAUKEE P, NIKKARI S, HENDRIKS HF. 2000. Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *Lancet* 355: 1522.

VAN GAAL LF, MERTENS IL, DE BLOCK CE. 2006. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444: 875-880.

VAN OMMEN B, STERUIM R.2002. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. *Curr Opin Biotechnol* 13: 517-521.

VAN STIPHOUT WA. 1986. Serum lipids in the young. An epidemiological view of early atherogenesis. Tesis doctoral. Universidad de Rotterdam.

VARELA-MOREIRAS G, ESCUDERO JM, ALONSO-APERTE E. 2007. Homocisteína, vitaminas relacionadas y estilo de vida en personas de edad avanzada: estudio Séneca. *Nutr Hosp* 22: 363-370.

VARELA-MOREIRAS G, ALGUACIL MERINO LF, ALONSO-APERTE E, ARANCETA BARTRINA J, AVILA TORRES JM, AZNAR LAÍN S, BELMONTE CORTÉS S, CABRERIZO GARCÍA L, DAL RE SAAVEDRA MÁ, DELGADO RUBIO A, GARAULET AZA M, GARCÍA LUNA PP, GIL HERNÁNDEZ A, GONZÁLEZ-GROSS M, LÓPEZ DÍAZ-UFANO ML, MARCOS SÁNCHEZ A, MARTÍNEZ DE VICTORIA MUÑOZ E, MARTÍNEZ VIZCAÍNO V, MORENO AZNAR L, MURILLO RAMOS JJ, ORDOVÁS MUÑOZ JM, ORTEGA ANTA RM, PALACIOS GIL-ANTUÑANO N, PALOU OLIVER



- A, PÉREZ RODRIGO C, RIOBÓ SERVÁN P, SERRA MAJEM L, TUR MARI J, URRIALDE DE ANDRÉS R, ZAMORA NAVARRO S. 2013. Consensus document and conclusions. Obesity and sedentarism in the 21<sup>st</sup> century: what can be done and what must be done? *Nutr Hosp* 28 Suppl 5: 1-12.
- VÁZQUEZ J, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ. 1994. Proteínas de pescado y metabolismo del colesterol. *Rev Esp Cienc Tecnol Alimen* 34: 589-608.
- VEERANNA V, ZALAWADIYA SK, NIRAJ A, PRADHAN J, FERENC B, BURACK RC, JACOB S, AFONSO L. 2011. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol* 58: 1025-33.
- VELDERS FP, DE WIT JE, JANSEN PW, JADDOE VW, HOFMAN A, et al. 2012. FTOat rs9939609, food responsiveness, emotional control and symptoms of ADHD in preschool children. *PLoS One* 7:e49131.
- VERSCHUREN WM, JACOBS DR, BLOEMBERG BP, KROMHOUT D, MENOTTI A, ARAVANIS C, BLACKBURN H, BUZINA R, DONTAS AS, FIDANZA F, KARVONEN MJ, NEDELIJKOVIĆ S, NISSINEN A, TOSHIMA H. 1995. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *JAMA* 274: 131-136.
- VESSBY B, UUSITUPA M, HERMANSEN K, RICCARDI G, RIVELLESE AA, TAPSELL LC, NÄLSÉN C, BERGLUND L, LOUHERANTA A, RASMUSSEN BM, CALVERT GD, MAFFETONE A, PEDERSEN E, GUSTAFSSON IB, STORLIEN LH; KANWU Study. 2001. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU study. *Diabetologia* 44: 312-319.
- VESSBY B, GUSTAFSSON IB, BOBERG J, KARLSTRÖM B, LITHELL H, WERNER I. 1980. Substituting polyunsaturated for saturated fat as a single change in a Swedish diet: effects on serum lipoprotein metabolism and glucose tolerance in patients with hyperlipoproteinaemia. *Eur J Clin Invest* 10: 193-202.
- VIDEIRA AMARAL JM, PEDRO E, APARICIO O, HALPERN MJ. 1986. Lipoprotein in neonates. En: Lipid metabolism and its pathology. Halpern MJ. (ed) Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. pp. 143-147.
- VON VERSEN-HOEYNCK FM, POWERS RW. 2007. Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci* 12: 2457-2470.
- WAHLEFELD AW. 1974. Triglycerides. Determination after enzymatic hydrolysis. En: Bergmeyer HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2<sup>nd</sup> English ed. Nueva York. Academic Press, Inc. pág 1831.
- WÅHLÉN K, SJÖLIN E, HOFFSTEDT J. 2008. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene *FTO* is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* 49: 607-611.

- WALLACE JM, BOURKE DA, AITKEN RP, MILNE JS, HAY WW JR. 2002. Placental glucose transport in growth restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *J Physiol* 547: 85-94.
- WALLDIUS G, JUNGNER I, AASTVEIT AH, HOLME I, FURBERG CD, SNIDERMAN AD. 2004. The ApoB/ApoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med* 42: 1355-1363.
- WANG M. 2005. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2: 3.
- WARDLE J, LLEWELLYN C, SANDERSON S, PLOMIN R. 2009. The FTO gene and measured food intake in children. *Int J Obes (Lond)* 33: 42-45.
- WATANABE Y. 1967 Study on lipid metabolism of the fetus. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi (Jap J Obstet Gynecol Soc)* 19: 1187-1193.
- WATZL B, BUB A, PRETZER G, ROSER S, BARTH SW, RECHKEMMER G. 2004. Daily moderate amounts of red wine or alcohol have no effect on the immune system of healthy men. *Eur J Clin Nutr* 58: 40-45.
- WILDING JP. 2007. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabet Med* 24: 934-945.
- WOOLET LA. 2011. Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta* 32 (Suppl 2): S218-S221.
- WICKS RJ. 1986. RNA molecular weight determination by agarose gel electrophoresis using formaldehyde as denaturant: comparison of RNA and DNA molecular weight markers. *Int J Biochem* 18: 277-278.
- WILLETT WC, LEIBEL RL. 2002. Dietary fat is not a major determinant of body fat. *Am J Med* 113: 47S-59S.
- WILLETT WC, SACKS F, TRICHOPOULOU A, DRESCHER G, FERRO-LUZZI A, HELSING E, TRICHOPOULOS D. 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 61 6 Suppl: 1402S-1406S.
- XING AY, CHALLIER JC, LEPERCQ J, CAÜZAC M, CHARRON MJ, GIRARD J, HAUGUEL-DE MOUZON S. 1998. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4097-4101.
- YLÄ-HERTTUALA S, PALINSKI W, ROSENFELD ME, PARTHASARATHY S, CAREW TE, BUTLER S, WITZTUM JL, STEINBERG D. 2000. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84: 1086-1095.

- YONEZAWA R, OKADA T, KITAMURA T, FUJITA H, INAMI I, MAKIMOTO M, HOSONO S, MINATO M, TAKAHASHI S, MUGISHIMA H, YAMAMOTO T, MASAOKA N. 2009. Very low-density lipoprotein in the cord blood of preterm neonates. *Metabolism* 58: 704-707.
- YOUNG M. 1981. Placental factors and fetal nutrition. *Am J Clin Nutr* 34: 738-743.
- YWASKEWYCZ BENÍTEZ LR, BONNEAU GA, CASTILLO RASCÓN MS, LÓPEZ DR, PEDROZO WR. 2010. Perfil lipídico por trimestre de gestación en una población de mujeres adultas. *Rev Chil Obstet Ginecol* 75: 227-233.
- ZABENA C, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ JL, MARTÍNEZ-LARRAD MT, TORRES-GARCÍA A, ALVAREZ-FERNÁNDEZ-REPRESA J, CORBATÓN-ANCHUELO A, PÉREZ-BARBA M, SERRANO-RÍOS M. 2009. The *FTO* obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 19: 87-95.
- ZACHARY T, BLOOMGARDEN MD. 2003. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 26: 933-939.
- ZHAO SP, HU S, HU M, LIU Q, WU Q, WU LJ, Zhang T. 2006. Association of human apolipoprotein A5 with lipid profiles affected by gender. *Clin Chem Acta* 376: 68-71.
- ZIMMET P, ALBERTI KG, KAUFMAN F, TAJIMA N, SILINK M, ARSLANIAN S, WONG G, BENNETT P, SHAW J, CAPRIO S; IDF Consensus Group. 2007a. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 8: 299-306.
- ZIMMET P, ALBERTI G, KAUFMAN F, TAJIMA N, SILINK M, ARSLANIAN S, WONG G, BENNETT P, SHAW J, CAPRIO S, on behalf of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention of Diabetes. 2007b. The metabolic syndrome in children and adolescents—how should it be defined? *Lancet* 369: 2059-2061.
- ZORZANO A, LASUNCIÓN M, HERRERA E. 1986. Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted pregnant rat. *Metabolism* 35: 297-303.